



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

(21) **PI 0721812-5 A2**

(22) Data de Depósito: 18/12/2007
(43) Data da Publicação: 10/04/2012
(RPI 2153)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/195
A01H 5/00

(54) Título: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, CONSTRUTO DE DNA, CÉLULA HOSPEDEIRA, PLANTA TRANSGÊNICA, SEMENTE TRANSFORMADA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO COM ATIVIDADE PESTICIDA, COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA CONTROLAR UMA POPULAÇÃO DE PRAGA DE LEPIDÓPTEROS OU DE COLEÓPTEROS, MÉTODO PARA MATAR UMA PRAGA DE LEPIDÓPTEROS OU COLEÓPTEROS, MÉTODO PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO COM ATIVIDADE PESTICIDA, PLANTA, MÉTODO PARA PROTEGER UMA PLANTA CONTRA UMA PRAGA

(30) Prioridade Unionista: 26/06/2007 US 60/946,216

(73) Titular(es): Pioneer Hi-Bred International, Inc.

(72) Inventor(es): André R. Abad, Cao Guo Yu, Hua Dong, Sue B. Lo, Xiaomei Shi

(74) Procurador(es): Ana Cristina Müller Wegmann

(86) Pedido Internacional: PCT US2007087856 de 18/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2009/002366de 31/12/2008

(57) Resumo: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, CONSTRUTO DE DNA, CÉLULA HOSPEDEIRA, PLANTA TRANSGÊNICA, SEMENTE TRANSFORMADA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO COM ATIVIDADE PESTICIDA, COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA CONTROLAR UMA POPULAÇÃO DE PRAGA DE LEPIDÓPTEROS OU DE COLEÓPTEROS, MÉTODO PARA MATAR UMA PRAGA DE LEPIDÓPTEROS OU COLEÓPTEROS, MÉTODO PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO COM ATIVIDADE PESTICIDA, PLANTA, MÉTODO PARA PROTEGER UMA PLANTA CONTRA UMA PRAGA. A invenção fornece ácidos nucleicos, e variantes e fragmentos destes, obtidos a partir de linhagens de *Bacillus thuringiensis* codificando polipeptídeos que tenham atividade pesticida contra pragas de insetos, incluindo *Lepidoptera*. Concretizações particulares da invenção fornecem ácidos nucleicos isolados que codificam proteínas pesticidas, composições pesticidas, construtos de DNA, microorganismos e plantas transformados contendo um ácido nucleico dos melhoramentos. Estas composições encontram uso de métodos para controlar pragas, especialmente pragas de plantas.

MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, CONSTRUTO DE DNA, CÉLULA
HOSPEDEIRA, PLANTA TRANSGÊNICA, SEMENTE TRANSFORMADA,
POLIPEPTÍDEO ISOLADO COM ATIVIDADE PESTICIDA, COMPOSIÇÃO,
MÉTODO PARA CONTROLAR UMA POPULAÇÃO DE PRAGA DE LEPIDÓPTEROS
5 OU DE COLEÓPTEROS, MÉTODO PARA MATAR UMA PRAGA DE
LEPIDÓPTEROS OU COLEÓPTEROS, MÉTODO PARA PRODUZIR UM
POLIPEPTÍDEO COM ATIVIDADE PESTICIDA, PLANTA, MÉTODO PARA
PROTEGER UMA PLANTA CONTRA UMA PRAGA

10

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a ácidos nucleicos
naturalmente ocorrentes e recombinantes obtidos a partir de
novos genes de *Bacillus thuringiensis* que codificam
15 polipeptídeos pesticidas caracterizados pela atividade
pesticida contra pragas de insetos. As composições e métodos
da invenção utilizam os ácidos nucleicos divulgados, e seus
polipeptídeos codificados como pesticidas, para controle de
pragas.

20

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os insetos constituem um fator importante na perda das
culturas agrícolas no mundo. Por exemplo, a alimentação da
25 lagarta-do-cartucho, o dano da lagarta-rosca ou o prejuízo da
broca-do-milho-europeu podem ser economicamente devastadores
para os produtores agrícolas. A perda de cultura relacionada

com praga de inseto e proveniente de ataques da broca-do-milho-europeu no campo e em milho doce apenas atinge cerca de um bilhão de dólares por ano em prejuízos e despesas de controle.

5

Tradicionalmente, o principal método para impactar as populações de insetos pragas, como populações de lagartarosca, é a aplicação de inseticidas químicos de amplo espectro. No entanto, consumidores e reguladores do governo estão igualmente cada vez mais preocupados com os riscos ambientais associados à produção e com uso de pesticidas químicos sintéticos. Devido a essas preocupações, os reguladores têm proibido ou limitado o uso de alguns dos pesticidas mais perigosos. Assim, existe um grande interesse no desenvolvimento de pesticidas alternativos.

O controle biológico de pragas de insetos de importância agrícola através de agentes microbianos, tais como fungos, bactérias ou outra espécie de inseto, oferece uma alternativa amigável com o ambiente e comercialmente atraente aos inseticidas químicos sintéticos. De um modo geral, o uso de biopesticidas apresenta um risco menor de poluição e de danos ambientais, e os bioinseticidas proporcionam maior especificidade ao alvo do que a caracteristicamente encontrada em inseticidas químicos de amplo espectro tradicionais. Além disso, a produção dos bioinseticidas custa

freqüentemente menos e, assim, estes melhoram o rendimento econômico para uma grande variedade de culturas.

Certas espécies de microrganismos do gênero *Bacillus* são conhecidas por possuir atividade pesticida contra uma ampla gama de insetos, incluindo Lepidóptera, Díptera, Coleóptera, Hemíptera, e outros. *Bacillus thuringiensis* (Bt) e *Bacillus papilliae* estão entre os mais bem sucedidos agentes de controle biológico descobertos até o presente momento. A patogenicidade de inseticidas também tem sido atribuída às linhagens de *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus* (Harwood, ed., ((1989) *Bacillus* (Plenum Press), 306) e *B. cereus* (WO 96/10083). A atividade pesticida parece estar concentrada em inclusões protéicas cristalinas ou cristais parasporais, apesar de que, proteínas pesticidas também já terem sido isoladas a partir do estágio de crescimento vegetativo de *Bacillus*. Vários genes que codificam estas proteínas pesticidas têm sido isolados e caracterizados (ver, por exemplo, U.S. Patent Nos. 5,366,892 e 5,840,868).

20

Inseticidas microbianos, particularmente aqueles obtidos a partir de linhagens de *Bacillus*, têm desempenhado um papel importante na agricultura como alternativas ao controle químico de pragas. Recentemente, os cientistas desenvolveram plantas agrícolas de culturas com resistência a insetos reforçada por engenharia genética de plantas cultivadas para a produção de proteínas pesticidas de *Bacillus*. Por exemplo,

25

plantas de milho e de algodão foram geneticamente modificadas para produzir proteínas pesticidas isoladas de cepas de *Bt* (ver, por exemplo, Aronson (2002) *Cell Mol. Life Sci.* 59 (3):417-425; Schnepf et al. (1998) *Microbiol Mol Biol Rev.* 62 (3) :775-806). Estes cultivar geneticamente modificados são agora amplamente utilizados na agricultura norte-americana e tem provido o agricultor com uma alternativa ecológica aos métodos tradicionais de controle de insetos. Além disso, as batatas geneticamente modificadas para conter toxinas Cry pesticidas foram vendidas para o fazendeiro americano. Estas plantas inseto-resistentes de culturas geneticamente modificadas, apesar de terem sido provadas como comercialmente muito bem sucedidas, oferecem resistência à apenas uma faixa estreita de pragas de insetos economicamente importantes.

Assim, a necessidade de novas toxinas *Bt*, com uma gama mais ampla de atividade inseticida contra pragas, permanece, como por exemplo, as toxinas que são ativas contra uma variedade maior de insetos da ordem Lepidóptera. Além disso, ainda há uma necessidade de biopesticidas que tenham atividade contra uma variedade de insetos e de biopesticidas que tenham a atividade inseticida melhorada.

Composições e métodos para impactar pragas de insetos são fornecidos. Mais especificamente, os melhoramentos da presente invenção referem-se aos métodos para se afetar insetos utilizando seqüências de nucleotídeos que codificam peptídeos inseticidas para produzir microorganismos e plantas transformadas que expressem um polipeptídeo inseticida dos melhoramentos. Estas pragas incluem pragas importantes para a agricultura, tais como, por exemplo: lagarta-amarela-do-colmo, *Scirpophaga incertulas* (Walker). Em alguns melhoramentos, as seqüências de nucleotídeos que codificam polipeptídeos pesticidas são para, pelo menos, um inseto pertencente à ordem Lepidóptera.

Os melhoramentos fornecem um ácido nucléico e fragmentos e variantes deste, que codificam polipeptídeos que possuem atividade pesticida contra pragas de insetos (por exemplo, SEQ ID NO: 1 codificando SEQ ID NO: 2). A seqüência nucleotídica tipo-selvagem do melhoramento (por exemplo, naturalmente ocorrente), que foi obtida a partir de *Bt*, codifica um peptídeo inseticida. Os melhoramentos ainda fornecem fragmentos e variantes da seqüência de nucleotídeos divulgada, que codificam polipeptídeos biologicamente ativos (por exemplo, inseticidas).

Os melhoramentos ainda fornecem polipeptídeos pesticidas isolados (por exemplo, inseticidas) codificados por um ácido nucléico do melhoramento tanto naturalmente ocorrente ou

modificado (por exemplo, mutagenizado ou manipulado). Nos exemplos particulares, as proteínas pesticidas do melhoramento incluem fragmentos ou proteínas de comprimento integral e polipeptídeos que são produzidos a partir de

5 ácidos nucleicos mutagenizados, concebidos para introduzir seqüências de aminoácidos particulares nos polipeptídeos dos melhoramentos. Em melhoramentos particulares, os polipeptídeos pesticidas têm atividade reforçada em relação à atividade do polipeptídeo que ocorre naturalmente e a partir

10 do qual estes são derivados.

Os ácidos nucleicos dos melhoramentos também podem ser usados para produzir plantas monocotiledôneas ou dicotiledôneas transformadas (por exemplo, transgênicos) que

15 se caracterizam por genomas que compreendem pelo menos um construto de nucleotídeo estavelmente incorporado constituído por uma seqüência de codificação dos melhoramentos operacionalmente ligada a um promotor que dirige a expressão do polipeptídeo pesticida codificado. Assim, as células

20 vegetais, tecidos vegetais, plantas e sementes transformadas a partir desta, também são fornecidas.

Em um melhoramento específico, uma planta transformada pode ser produzida usando-se um ácido nucleico que foi

25 otimizado para a expressão aumentada em uma planta hospedeira. Por exemplo, um dos polipeptídeos pesticidas dos melhoramentos pode ser retro-traduzido para produzir um ácido

nucléico compreendendo códons otimizados para a expressão em um determinado hospedeiro, por exemplo, uma planta de cultivo, como uma planta de arroz (*Oryza sativa*). A expressão de uma sequência de codificação por uma destas plantas transformadas (por exemplo, uma dicotiledônea ou monocotiledônea) irá resultar na produção de um polipeptídeo pesticida e conferir à planta uma resistência contra insetos aumentada. Alguns melhoramentos fornecem plantas transgênicas expressando polipeptídeos pesticidas para os quais se encontram métodos de uso para impactar várias pragas de insetos.

Os melhoramentos incluem ainda composições de pesticidas ou inseticidas contendo os polipeptídeos inseticidas do melhoramento e podem opcionalmente, incluir outros peptídeos inseticidas. Os melhoramentos englobam a aplicação de tais composições ao ambiente de pragas de insetos, com a finalidade de impactar estas pragas de insetos.

20 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os melhoramentos da invenção são conduzidos para as composições e métodos de impacto de pragas de insetos, particularmente pragas de plantas. Mais especificamente, o ácido nucléico isolado dos melhoramentos, e fragmentos e variantes deste, incluem sequências de nucleotídeos que codificam polipeptídeos pesticidas (por exemplo, proteínas).

As proteínas pesticidas divulgadas são biologicamente ativas (por exemplo, pesticidas) contra as pragas de insetos, tais como, mas não se limitando a, insetos-praga da ordem Lepidóptera. Os insetos de interesse incluem, mas não estão

5 limitados a: lagarta-amarela-do-colmo, por exemplo, *Scirpophaga incertulas*; broca-do-milho-europeu, por exemplo, *Ostrinia nubilalis*; lagarta-da-espiga, por exemplo, *Helicoverpa zea*; broca-comum-do-pedúnculo, por exemplo, *Papiapema nebris*; lagarta-

10 do-cartucho, por exemplo, *Pseudaletia unipuncta*; broca-do-milho-do-sudoeste, por exemplo, *Diatraea grandiosella*; lagarta-rosca, por exemplo, *Agrotis ipsilon*; lagarta-da-beterraba, por exemplo, *Spodoptera frugiperda*, lagarta-

15 cartucho-do-outono, por exemplo, *Spodoptera exigua* e mariposa-dorso-de-diamante, por exemplo, *Plutella xylostella*.

As composições dos melhoramentos incluem ácidos nucléicos isolados e fragmentos e variantes dos mesmos, que codificam polipeptídeos pesticidas, cassetes de expressão

20 compreendendo as seqüências de nucleotídeos dos melhoramentos, proteínas pesticidas isoladas, e composições pesticidas. Alguns melhoramentos fornecem polipeptídeos pesticidas modificados, caracterizados por conter uma

25 atividade inseticida contra lepidópteros melhor em relação à atividade pesticida da proteína tipo selvagem correspondente. Os melhoramentos ainda fornecem plantas e microorganismos transformados com estes novos ácidos nucléicos, e métodos que

envolvem a utilização desses ácidos nucléicos, composições pesticidas, organismos transformados e produtos destes no impacto de pragas de insetos.

- 5 Os ácidos nucléicos e sequências de nucleotídeos dos melhoramentos podem ser utilizados para transformar todo o organismo para produzir as proteínas pesticidas codificadas. Métodos que envolvem o uso desses organismos transformados são fornecidos para impacto ou controle de pragas de plantas.
- 10 Os ácidos nucléicos e sequências de nucleotídeos dos melhoramentos também podem ser usados para transformar organelas como os cloroplastos (McBride *et al.* (1995) *Biotechnology* 13: 362-365; e Kota *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1840-1845).

15

- Os melhoramentos ainda dizem respeito à identificação de fragmentos e variantes da sequência de codificação naturalmente ocorrente que codificam proteínas pesticidas biologicamente ativas. As sequências de nucleotídeos dos
- 20 melhoramentos encontram uso direto em métodos para afetar as pragas, principalmente insetos, como as pragas da ordem Lepidóptera. Desta forma, os melhoramentos providenciam novas abordagens para se impactar insetos praga as quais não dependem do uso dos inseticidas químicos sintéticos
- 25 tradicionais. Os melhoramentos envolvem a descoberta de pesticidas biodegradáveis naturalmente ocorrentes e dos genes que codificam estes.

Os melhoramentos ainda fornecem fragmentos e variantes da sequência de codificação naturalmente ocorrente que também codificam polipeptídeos biologicamente ativos (por exemplo, 5 pesticidas). Os ácidos nucleicos dos melhoramentos abrangem ácidos nucleicos ou sequências de nucleotídeos que foram otimizados para expressão pelas células de um organismo em particular, por exemplo, sequências de ácido nucleico que foram retro-traduzidas (ou seja, traduzidos de forma 10 invertida), utilizando-se códonos preferenciais de plantas e baseados na sequência de aminoácidos de um polipeptídeo com atividade pesticida reforçada. Os melhoramentos ainda prevêm mutações que conferem propriedades melhoradas ou alteradas aos polipeptídeos dos melhoramentos. Ver, por exemplo, U.S. 15 Application Nos. 10/606,320 pendente, arquivada em 25 de junho de 2003, e 10/746,914, arquivada em 24 de dezembro de 2003.

Na descrição que se segue, uma série de termos é usada 20 extensivamente. As seguintes definições são fornecidas para facilitar a compreensão dos melhoramentos.

Unidades, prefixos e símbolos podem ser notados em seus formulários SI aceitos. Salvo indicação em contrário, os 25 ácidos nucleicos são escritos da esquerda para a direita em orientação 5' para 3'; sequências de aminoácidos são escritas da esquerda para a direita na orientação amino para carboxi,

respectivamente. Intervalos numéricos são inclusivos dos números que definem o intervalo. Os aminoácidos podem ser aqui referidos tanto pelos seus símbolos comumente conhecidos de três letras ou pelos símbolos de uma letra recomendados pela Comissão de Nomenclatura Bioquímica (*Biochemical Nomenclature Commission*) IUPAC-IUB. Nucleotídeos, de igual modo, podem ser referidos por seus códigos de letras simples comumente aceitos. Os termos acima definidos são mais plenamente definidos por referência a especificação como um todo.

Como usado aqui, "ácido nucléico" inclui referência a um polímero de ribonucleotídeo ou desoxirribonucleotídeo, seja na forma de fita simples ou de fita dupla, e, salvo se limitado, englobando análogos conhecidos (por exemplo, ácidos nucléicos de peptídeos), tendo a natureza essencial dos nucleotídeos naturais, no contexto em que, estes hibridizam com ácidos nucléicos de fita simples de uma maneira semelhante aos nucleotídeos de ocorrência natural.

20

Conforme utilizado aqui, os termos "codificação" ou "codificado" quando usados no contexto de um determinado ácido nucléico, significa que o ácido nucléico compreende as informações necessárias à tradução direta da sequência de nucleotídeos em uma proteína especificada. A informação pela qual uma proteína é codificada é especificada pelo uso de códons. Um ácido nucléico que codifica uma proteína pode

conter seqüências não-traduzidas (por exemplo, íntrons) dentro de regiões traduzidas do ácido nucléico ou podem não conter estas seqüências não-traduzidas de intervenção (como no cDNA por exemplo).

5

Como usado aqui, "seqüência de tamanho integral", refere-se a um polinucleotídeo especificado ou a sua respectiva proteína codificada, e significa ter-se a seqüência de ácido nucléico inteira ou a seqüência de aminoácidos inteira de uma seqüência nativa (não sintética) endógena. Um polinucleotídeo de tamanho integral codifica a forma cataliticamente ativa e integral de uma proteína especificada.

15 Conforme utilizado aqui, o termo "antisenso" usado no contexto da orientação de uma seqüência de nucleotídeos se refere a uma seqüência de polinucleotídeo duplex que é operacionalmente ligada a um promotor em uma orientação onde a fita antisenso é transcrita. A fita antisenso é

20 suficientemente complementar para um produto da transcrição endógena, de tal forma que a tradução do produto da transcrição endógena é normalmente inibida. Assim, quando o termo "antisenso" é utilizado no contexto de uma seqüência de nucleotídeos especifica, o termo se refere à fita

25 complementar do produto de transcrição referência.

Os termos "polipeptídeo", "peptídeo", e "proteínas" são utilizados aqui alternadamente para se referir a um polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos se aplicam a polímeros de aminoácidos em que um ou mais resíduos de aminoácidos é um
5 análogo químico artificial de um aminoácido naturalmente
ocorrente correspondente, assim como a polímeros de
aminoácidos naturalmente ocorrentes.

Os termos "resíduo" ou "resíduo de aminoácido" ou
10 "aminoácidos" são utilizados alternadamente aqui para se
referir a um aminoácido que é incorporado em uma proteína,
polipeptídeo, ou peptídeo (coletivamente "proteína"). O
aminoácido pode ser um aminoácido que ocorre naturalmente e,
a menos que de outra forma limitado, pode abranger análogos
15 conhecidos de aminoácidos naturais que podem funcionar de
forma semelhante aos aminoácidos que ocorrem naturalmente.

Polipeptídeos dos melhoramentos podem ser produzidos a
partir de um ácido nucléico aqui divulgado, ou através do uso
20 de técnicas padronizadas de biologia molecular. Por exemplo,
uma proteína do melhoramento pode ser produzida pela
expressão de um ácido nucléico recombinante do melhoramento
em uma célula hospedeira apropriada, ou, alternadamente, por
uma combinação de procedimentos *ex vivo*.

25

Conforme utilizado aqui, os termos "isolado" e
"purificado" são utilizados indiferentemente para designar os

ácidos nucléicos e polipeptídeos biologicamente ativos ou partes dos mesmos, que são substancialmente ou essencialmente livres de componentes que normalmente acompanham ou interagem com o ácido nucléico ou polipeptídeo na forma em que este se encontra em seu ambiente natural. Assim, um isolado ou purificado de ácido nucléico ou polipeptídeo é substancialmente isento seja de material celular seja de meio de cultura, quando produzidos por técnicas de recombinação, ou substancialmente livre de precursores químicos ou outros produtos químicos quando quimicamente sintetizados.

Um "ácido nucléico isolado" é geralmente livre de seqüências (como, por exemplo, das seqüências codificadoras de proteínas) que naturalmente cercam o ácido nucléico (ou seja, seqüências localizadas nas extremidades 5' e 3' do ácido nucléico) no DNA genômico do organismo do qual o ácido nucléico é derivado. Por exemplo, em vários melhoramentos, os ácidos nucléicos isolados podem conter menos que cerca de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, ou 0,1 kb de seqüências de nucleotídeos que naturalmente circundam o ácidos nucléico no DNA genômico da célula a partir do qual o ácido nucléico é derivado.

Conforme utilizado aqui, o termo "isolado" ou "purificado", conforme ele é usado para se referir a um polipeptídeo dos melhoramentos, significa que a proteína isolada é praticamente isenta de material genético e inclui

preparados de proteínas com menos de cerca de 30%, 20% , 10%, ou 5% (em peso seco) de proteínas contaminantes. Quando a proteína do melhoramento ou sua porção biologicamente ativa recombinante é produzida, o meio de cultura representa menos
5 cerca de 30%, 20%, 10%, ou 5% (em peso seco) dos precursores químicos ou químicos não-proteínas-de-interesse.

Para toda a especificação da palavra "compreender", ou variações como "compreende" ou "compreendendo", deverá ser
10 implicado a inclusão de um elemento indicado, inteiro ou etapa, ou grupo de elementos, inteiros ou etapas, mas não a exclusão de qualquer outro elemento, inteiro ou etapa, ou grupo de elementos, inteiros ou etapas.

15 Conforme aqui utilizado, o termo "impactando pragas de insetos" refere-se a efetuação de mudanças na alimentação do inseto, crescimento e/ou comportamento em qualquer fase de desenvolvimento, incluindo mas não se limitando a: matar o inseto, retardar o crescimento e prevenir a capacidade
20 reprodutiva, atividade anti-alimentar e assim por diante.

Conforme utilizado aqui, os termos "atividade pesticida" e "atividade inseticida" são usados como sinônimos para se referir à atividade de um organismo ou de uma substância
25 (como, por exemplo, uma proteína) que pode ser medida pelo, mas não está limitada a, mortalidade de pragas, perda de peso de pragas, repelência de pragas e outras alterações

comportamentais e físicas de uma praga após a alimentação e exposição por um período de tempo adequado. Assim, um organismo ou substância com atividade pesticida impacta negativamente pelo menos um parâmetro mensurável de aptidão de pragas. Por exemplo, "proteínas pesticidas" são proteínas que mostram atividade pesticida por si só ou em combinação com outras proteínas.

Conforme utilizado aqui, o termo "quantidade pesticida ativa" conota uma quantidade de uma substância ou de organismo que tem atividade como pesticida quando presente no ambiente de uma praga. Para cada substância ou organismo, a quantidade pesticida efetiva é determinada empiricamente para cada praga afetada em um ambiente específico. Da mesma forma, "quantidade de inseticida eficaz" pode ser utilizada para se referir a uma quantidade "pesticida eficaz" quando a praga é uma praga de insetos.

Conforme utilizado aqui, o termo "modificado por recombinação" ou "modificado" conota a utilização da tecnologia de DNA recombinante para introduzir (por exemplo, por engenharia genética) uma mudança na estrutura de proteínas com base em uma compreensão do mecanismo de ação da proteína e sobre uma consideração dos aminoácidos a serem introduzidos, deletados ou substituídos.

Conforme utilizado aqui, o termo "seqüência de nucleotídeos mutante" ou "mutação" ou "seqüência de nucleotídeos mutagenizada" denota uma seqüência de nucleotídeos que foi mutagenizada ou alterada para conter um
5 ou mais resíduos de nucleotídeos (por exemplo, pares de bases) que não está presente na seqüência tipo selvagem correspondente. Mutagênese ou alteração consiste em uma ou mais adições, exclusões ou substituições ou reposições de resíduos de ácido nucléico. Quando as mutações são feitas
10 através da adição, remoção ou substituição de um aminoácido de um sítio proteolítico, essa adição, remoção ou substituição pode ser dentro ou adjacente ao motivo do sítio proteolítico, com tanto que o objeto da mutação seja realizado (ou seja, com tanto que a proteólise no local seja
15 alterada).

Uma seqüência de nucleotídeos pode codificar uma toxina inseticida mutante mostrando uma atividade inseticida aumentada ou diminuída, ou uma seqüência de aminoácidos que
20 confira aumento ou diminuição da atividade inseticida em um polipeptídeo que a contenha. Conforme utilizado aqui, o termo "mutante" ou "mutação" no contexto de uma proteína, um polipeptídeo ou uma seqüência de aminoácidos, se refere a uma seqüência que tenha sido mutagenizada ou alterada para conter
25 um ou mais resíduos de aminoácidos que não estão presentes na seqüência correspondente do tipo selvagem. Mutagênese ou alteração consiste em uma ou mais adições, exclusões,

substituições ou reposições de resíduos de aminoácidos. Um polipeptídeo mutante mostra aumento ou diminuição da atividade inseticida, ou representa uma seqüência de aminoácidos que confere a melhor atividade inseticida em um

5 polipeptídeo que a contenha. Assim, o termo "mutante" ou "mutação" refere-se a uma ou ambas as seqüências de nucleotídeos mutantes e aminoácidos codificados. Mutantes podem ser usados sozinhos ou em qualquer combinação compatível com outros mutantes dos melhoramentos ou com

10 outros mutantes. Um "polipeptídeo mutante" pode inversamente mostrar uma diminuição na atividade inseticida. Quando mais de uma mutação é adicionada a um ácido nucléico ou proteína em particular, as mutações podem ser adicionadas ao mesmo tempo ou seqüencialmente, se seqüencialmente, as mutações

15 podem ser adicionadas em qualquer ordem adequada.

Conforme utilizado aqui, o termo "melhor atividade inseticida" ou "melhor atividade pesticida" refere-se a um polipeptídeo inseticida dos melhoramentos que realçou a

20 atividade inseticida em relação à atividade de sua proteína tipo selvagem correspondente, e/ou um polipeptídeo inseticida que é eficaz contra uma ampla gama de insetos e/ou um polipeptídeo inseticida tendo especificidade para um inseto que não é suscetível à toxicidade da proteína tipo selvagem.

25 Um achado de melhor ou aumentada atividade pesticida, exige a demonstração de um aumento da atividade pesticida contra os insetos-alvo, de pelo menos 10%, ou de pelo menos 20%, 25%,

30%, 35%, 40%, 45%, 50 %, 60%, 70%, 100%, 150%, 200% ou 300% ou mais de aumento de atividade pesticida em relação à atividade pesticida do determinado polipeptídeo inseticida tipo selvagem contra o mesmo inseto.

5

Por exemplo, uma atividade inseticida ou pesticida melhorada é fornecida, onde uma gama mais ampla ou mais estreita de insetos é afetada pelo polipeptídeo em relação à variedade de insetos que é afetada por uma toxina *Bt* tipo-selvagem. Uma ampla gama de impacto pode ser desejável, onde a versatilidade é desejada, enquanto que um leque restrito de impacto pode ser desejável, quando, por exemplo, insetos benéficos poderiam de outra forma, ser impactados pelo uso ou presença da toxina. Enquanto os melhoramentos não estão vinculados a qualquer mecanismo específico de ação, uma melhora na atividade pesticida também pode ser fornecida por mudanças em uma ou mais das características de um polipeptídeo, por exemplo, a estabilidade ou a longevidade de um polipeptídeo em um intestino de inseto pode ser aumentada em relação a estabilidade ou a longevidade de uma proteína tipo selvagem correspondente.

O termo "tóxico", usado aqui se refere a um polipeptídeo que mostra atividade pesticida ou atividade inseticida ou, atividade pesticida melhorada ou atividade inseticida melhorada. "*Bt*" ou toxina de "*Bacillus thuringiensis*" destina-se a incluir a classe mais ampla de toxinas *Cry*

encontradas em várias linhagens de *Bt*, que incluem toxinas, como, por exemplo, *Cry1s*, *Cry2s*, ou *Cry3s*.

Os termos "sítio proteolítico" ou "clivagem" referem-se a uma seqüência de aminoácidos que confere a sensibilidade para uma classe de proteases ou uma protease específica, de forma que um polipeptídio que contem a seqüência de aminoácidos é digerido pela classe de proteases ou protease em particular. Um sítio proteolítico é dito "sensível" para a protease (s) que reconhece(m) esse sítio. É apreciado na arte que a eficiência da digestão irá variar, e que uma diminuição na eficiência de digestão pode levar a um aumento na estabilidade ou longevidade do polipeptídeo no intestino de um inseto. Assim, um sítio proteolítico pode conferir a sensibilidade para mais de uma protease ou classe de proteases, mas a eficiência da digestão nesse local por várias proteases pode variar. Sítios proteolíticos incluem, por exemplo, sítios de tripsina, sítios de quimotripsina e sítios de elastase.

20

A pesquisa mostrou que as proteases do intestino de insetos lepidópteros incluem tripsinas, quimotripsinas e elastases. Veja, por exemplo, Lenz et al. (1991) *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 16: 201-212; e Hedegus et al. (2003) *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 53: 30-47. Por exemplo, cerca de 18 diferentes tripsinas foram encontradas no intestino médio de larvas de *Helicoverpa armigera* (ver Gatehouse et al. (1997)

Insect Biochem. Mol. Biol. 27: 929-944). Os sítios proteolíticos de substrato preferidos destas proteases têm sido investigados. Veja, por exemplo, Peterson et al. (1995) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 765-774.

5

Esforços têm sido feitos para se compreender o mecanismo de ação das toxinas *Bt* e das toxinas modificadas com propriedades melhoradas. Tem sido demonstrado que as proteases do intestino de insetos podem afetar o impacto das proteínas *Cry* de *Bt* sobre o inseto. Algumas proteases ativam as proteínas *Cry*, através do processamento delas a partir de uma forma protoxina em uma forma tóxica ou uma "toxina." Veja, Oppert (1999) *Arch. Insect Biochem. Phys.* 42: 1-12; e Carroll et al. (1997) *J. Invertebrate Pathology* 70: 41-49.

Essa ativação da toxina pode incluir a remoção dos peptídeos N- e C-terminal da proteína e pode incluir também a clivagem interna da proteína. Outras proteases podem degradar as proteínas *Cry*. Veja Oppert, *ibid*.

A comparação das seqüências de aminoácidos das toxinas *Cry* de diferentes especificidades revela cinco blocos de seqüência altamente conservados. Estruturalmente, as toxinas compreendem três áreas distintas que são a partir do N- para o C-terminal: um grupo de sete alfa-hélices envolvidas na formação de poros (referidas como "domínio 1"), três folhas beta anti-paralelas implicadas na ligação celular (designadas por "domínio 2"), e um sanduíche beta (designado por "domínio

3"). A localização e as propriedades desses domínios são conhecidas daqueles com habilidade na arte. Veja, por exemplo, Li et al. (1991) *Nature*, 305:815-821 e Morse et al. (2001) *Structure*, 9:409-417. Quando é feita referência a um determinado domínio, como o domínio 1, entende-se que os parâmetros exatos do domínio em relação a uma determinada sequência não são críticos, desde que a sequência ou a parte destas incluam a sequência que fornece pelo menos alguma função atribuída ao domínio em particular. Assim, por exemplo, quando se refere ao domínio "1", pretende-se que uma determinada sequência inclua um conjunto de sete alfa-hélices, mas os pontos finais exatos da sequência utilizada ou referida a qual se relaciona este conjunto não são críticos. Aquele com habilidades na arte está familiarizado com a determinação de tais parâmetros e a avaliação de tais funções.

Em um esforço para melhor caracterizar e melhorar as toxinas *Bt*, linhagens da bactéria *Bt* foram estudadas. Descobriu-se que preparações cristal preparadas a partir de culturas de linhagens de *Bt* tinham atividade pesticida contra a broca-do-milho-europeu (ver, por exemplo, exemplos experimentais 1, 2 e 3). Um esforço foi feito para se identificar as sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas de cristal de variedades selecionadas e os ácidos nucléicos do tipo selvagem (isto é, naturalmente ocorrente) dos melhoramentos foram isolados de linhagens bacterianas,

clonados em um vetor de expressão, e transformados em *E coli*.
Dependendo das características de uma dada preparação, foi
reconhecido que a demonstração da atividade pesticida, por
vezes, necessita de um pré-tratamento com tripsina para
5 ativar as proteínas pesticidas. Assim, entende-se que algumas
proteínas pesticidas requerem digestão por protease (por
exemplo, tripsina, quimotripsina, etc) para a ativação,
enquanto outras proteínas são biologicamente ativas (por
exemplo, pesticidas), na ausência de tal ativação.

10

Tais moléculas podem ser alteradas por meios descritos,
por exemplo, nas U.S. Application Nos. 10/606,320, arquivada
25 de junho de 2003, e 10/746,914, arquivada em 24 de
dezembro de 2003. Além disso, seqüências de ácido nucléicos
15 podem ser projetadas para codificar polipeptídeos que contêm
mutações adicionais que conferem atividade pesticida
melhoradas ou alteradas em relação à atividade pesticida do
polipeptídeo naturalmente ocorrente. As seqüências
nucleotídicas dos ácidos nucléicos de tais engenharias
20 compreendem mutações não encontradas nas seqüências do tipo
selvagem.

Os polipeptídeos mutantes dos melhoramentos são
geralmente preparados por um processo que envolve as etapas
25 de: obtenção de uma seqüência de ácido nucléico que codifica
um polipeptídeo da família Cry, análise da estrutura do
polipeptídeo para identificação de determinados sítios "alvo"

para mutagênese da sequência do gene subjacente com base na ponderação da função proposta para o domínio alvo no modo de ação da toxina; introdução de uma ou mais mutações na sequência de ácido nucléico para produzir uma mudança
5 desejada em um ou mais resíduos de aminoácidos da sequência do polipeptídeo codificado e testar o polipeptídeo produzido para a atividade pesticida.

Muitas das toxinas *Bt* inseticidas estão relacionadas em
10 vários graus de semelhança em suas sequências de aminoácidos e estrutura terciária e, meios para se obter as estruturas de cristais das toxinas *Bt* são bem conhecidos. Soluções de alta resolução da estrutura cristalina exemplar para ambos os polipeptídeos *Cry3A* e *Cry3B* estão disponíveis na literatura.
15 A estrutura resolvida do gene *Cry3A* (Li *et al.* (1991) *Nature* 353:815-821) fornece compreensões sobre a relação entre a estrutura e a função da toxina. Uma consideração combinada das análises de estrutura de toxinas *Bt* publicadas, e da função associada às estruturas, motivos, ou similares
20 particularmente reportados, indica que regiões específicas da toxina são correlacionadas com funções específicas e etapas distintas do modo de ação da proteína. Por exemplo, muitas toxinas isoladas de *Bt* são geralmente descritas como compostas por três domínios: um pacote de sete-hélices que
25 está envolvido na formação de poros, um domínio de três folhas de que tem sido relacionado à ligação ao receptor, e

um motivo beta-sanduiche (Li et al. (1991) *Nature* 305: 815-821).

Conforme relatado na U.S. Patent No. 7,105,332, e na
5 U.S. Application No. 10/746,914 pendente, arquivada em 24 de
dezembro de 2003, a toxicidade das proteínas Cry pode ser
melhorada, alvejando-se a região localizada entre as alfa-
hélices 3 e 4 do domínio 1 da toxina . Esta teoria era
embasada em um corpo de conhecimento sobre toxinas
10 inseticidas, incluindo: 1) foi reportado que as alfa hélices
4 e 5 do domínio 1 das toxinas Cry3A se inserem na bicamada
lipídica das células do epitélio do intestino médio de
insetos suscetíveis (Gazit et al. (1998) *Proc. Natl. Acad.
Sci. USA* 95: 12289-12294), 2) o conhecimento dos inventores
15 sobre a localização dos sítios de clivagem da tripsina e
quimotripsina dentro da sequência de aminoácidos da proteína
do tipo selvagem, 3) a observação de que a proteína de tipo
selvagem foi mais ativa contra certos insetos após a ativação
in vitro através do tratamento com tripsina ou quimotripsina
20 e 4) relato de que a digestão de toxinas a partir do 3'
terminal resultou na diminuição da toxicidade para insetos.

Uma série de mutações pode ser criada e colocada em uma
variedade de sequências de base para se criar novos
25 polipeptídeos tendo atividade pesticida melhorada ou
alterada. Ver, por exemplo, U.S. Application Nos. 10/606,320,
arquivada em 25 de junho de 2003, agora abandonada, e

10/746,914, arquivada em 24 de dezembro de 2003. Estes
mutantes incluem, mas não estão limitados a: a adição de pelo
menos mais um sítio sensível a protease (por exemplo,
clivagem por tripsina) na região localizada entre as hélices
5 de 3 e 4 do domínio 1, a substituição de um sítio sensível da
protease original na sequência do tipo selvagem, por um sítio
sensível de uma protease diferente, a adição de múltiplos
sítios sensíveis a protease em um determinado local, a adição
de resíduos de aminoácidos próximos do sítio sensível a
10 protease (s) a alteração do dobramento do polipeptídeo para,
assim, melhorar a digestão do polipeptídeo no sítio protease-
sensível (s), e a adição de mutações para proteger o
polipeptídeo da digestão de degradação, que reduz a
toxicidade (por exemplo, fazendo uma série de mutações nas
15 quais o aminoácido do tipo selvagem é substituído pelo
aminoácido valina para proteger o polipeptídeo da digestão).
As mutações podem ser utilizadas separadamente ou em qualquer
combinação para fornecer polipeptídeos dos melhoramentos.

20 Desta forma, os melhoramentos fornecem sequências que
compreendem uma variedade de mutações, como, por exemplo, uma
mutação que compreende um sítio protease-sensível adicional,
ou alternativo, localizado entre as alfa-hélices 3 e 4 do
domínio 1 do polipeptídeo codificado . Uma mutação que é um
25 sítio protease-sensível adicional ou alternativo pode ser
sensível a várias classes de proteases, tais como proteases
de serina, o que inclui tripsina e quimotripsina, ou enzimas

como a elastase. Assim, uma mutação que é um sítio protease-sensível adicional ou alternativo pode ser projetada de modo que o sítio seja prontamente reconhecido e/ou clivado por uma categoria de proteases, como as proteases de mamíferos ou proteases de insetos. Um sítio protease-sensível pode também ser concebido para ser clivado por uma determinada classe de enzimas ou por uma enzima em particular conhecida por ser produzida em um organismo, como, por exemplo, uma quimotripsina produzida pela lagarta-da-espiga *Heliothis zea* (Lenz et al. (1991) *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 16: 201-212). As mutações podem conferir resistência à digestão proteolítica, por exemplo, a digestão por quimotripsina na região C-terminal do peptídeo.

A presença de um sítio protease-sensível adicional ou alternativo na sequência de aminoácidos do polipeptídeo codificado pode melhorar a atividade pesticida e/ou a especificidade do polipeptídeo codificado pelos ácidos nucleicos dos melhoramentos. Assim, as sequências de nucleotídeos dos melhoramentos podem ser recombinantes ou geneticamente manipuladas para produzir polipeptídeos tendo a atividade inseticida e/ou a especificidade melhorada ou alterada quando comparada com a de uma toxina tipo selvagem inalterada. Além disso, as mutações divulgadas aqui podem ser colocadas ou utilizadas em conjunto com outras sequências de nucleotídeos para fornecer as propriedades melhoradas. Por exemplo, um sítio protease-sensível, que é rapidamente

clivado por quimotripsina de inseto, por exemplo, uma quimotripsina encontrada na lagarta-cartucho bertha ou na lagarta-cartucho-de-milho (Hegedus et al. (2003) *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 53: 30-47; e Lenz et al. (1991) *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 16: 201-212), pode ser colocada em uma sequência Cry base para fornecer toxicidade melhorada a essa sequência. Desta forma, os melhoramentos fornecem polipeptídeos tóxicos com propriedades melhoradas.

10 Por exemplo, uma sequência de nucleotídeos Cry mutagenizada pode incluir mutantes adicionais que compreendem códons adicionais que introduzem uma segunda sequência de aminoácido tripsina-sensível (além do sítio de tripsina natural) no polipeptídeo codificado. Um mutante adicional

15 alternativo dos melhoramentos compreende códons adicionais destinados a introduzir, pelo menos, um diferente sítio protease-sensível adicional para o polipeptídeo, por exemplo, um sítio quimotripsina-sensível localizado imediatamente a 5' ou a 3' do sítio de tripsina que ocorre naturalmente.

20 Alternativamente, mutantes de substituição podem ser criados em que pelo menos um códon do ácido nucléico que codifica o sítio protease-sensível naturalmente ocorrente é destruído e códons alternativos são introduzidos na sequência de ácido nucléico, a fim de proporcionar um sítio protease-sensível

25 diferente (por exemplo, substituto). Um mutante de substituição também pode ser adicionado a uma sequência Cry na qual o sítio de clivagem de tripsina naturalmente

ocorrente presente no polipeptídeo codificado é destruído e um sítio de clivagem para quimotripsina ou elastase é introduzido em seu lugar.

5 É sabido que qualquer seqüência de nucleotídeos que codifica uma seqüência de aminoácidos que são sítios proteolíticos ou sítios proteolíticos hipotéticos (por exemplo, grupos como NGSR, RR, ou LKM) pode ser utilizada e que a identidade exata dos códons utilizados para introduzir
10 qualquer um destes sítios de clivagem em um polipeptídeo variante pode variar dependendo da utilização, ou seja, expressão de uma determinada planta. Também é reconhecido que qualquer uma das mutações divulgadas pode ser introduzida em qualquer seqüência de nucleotídeos dos melhoramentos que
15 compreendem os códons para resíduos de aminoácidos que fornecem o sítio de clivagem de tripsina nativo que é alvo de modificação. Assim, as variantes tanto de uma toxina de tamanho integral ou fragmentos desta podem ser modificadas para conter sítios de clivagem adicionais ou alternativos, e
20 esses melhoramentos se destinam a ser abrangidos pelo âmbito de aplicação dos melhoramentos aqui divulgados.

 Será apreciado por aqueles com habilidade na arte que qualquer mutação útil pode ser adicionada às seqüências dos
25 melhoramentos, desde que os polipeptídeos codificados mantenham a atividade pesticida. Assim, seqüências também podem ser transformadas de modo a que os polipeptídeos

codificados sejam resistentes à digestão proteolítica pela quimotripsina. Mais de um sítio de reconhecimento pode ser adicionado em um local especial em qualquer combinação, e múltiplos sítios de reconhecimento podem ser adicionados ou
5 removidos da toxina. Assim, mutações adicionais podem incluir três, quatro ou mais sítios de reconhecimento. É preciso reconhecer que mutações múltiplas podem ser projetadas em qualquer sequência de polinucleotídeo adequada; em conformidade, seqüências integrais ou fragmentos destas podem
10 ser modificados para conter sítios de clivagem adicionais ou alternativos, bem como ser resistente à digestão proteolítica. Desta forma, os melhoramentos fornecem toxinas Cry contendo mutações que melhoram a atividade de pesticidas, bem como composições melhoradas e métodos para impactar as
15 pragas utilizando outras toxinas *Bt*.

As mutações podem proteger o polipeptídeo da degradação por protease, por exemplo, retirando-se os sítios proteolíticos hipotéticos como sítios de serina protease
20 hipotéticos e sítios de reconhecimento de elastase de diferentes áreas. Alguns ou todos esses sítios hipotéticos podem ser removidos ou alterados de modo que a proteólise no local do sítio original é diminuída. Alterações na proteólise podem ser avaliadas comparando-se um polipeptídeo mutante com
25 toxinas do tipo selvagem ou comparando-se toxinas mutantes que diferem em sua sequência de aminoácidos. Sítios proteolíticos e sítios proteolíticos hipotéticos incluem, mas

não estão limitados a, as seguintes seqüências: RR, um sítio de clivagem da tripsina; LKM, um sítio de quimotripsina e NGSR, um sítio de tripsina. Esses sítios podem ser alterados pela adição ou supressão de qualquer número e tipo de
5 resíduos de aminoácidos, enquanto a atividade pesticida do polipeptídeo é aumentada. Assim, polipeptídeos codificados por seqüências de nucleotídeos compreendendo mutações incluirão, pelo menos, uma mudança ou adição de aminoácidos em relação ao nativo ou seqüência de base, ou 2, 3, 4, 5, 6,
10 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 35, 38, 40, 45, 47, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, ou 280 ou mais alterações ou adições de aminoácidos.

15

Em melhoramentos particulares, as proteínas pesticidas dos melhoramentos fornecem polipeptídeos inseticidas de tamanho integral, fragmentos dos polipeptídeos inseticidas de tamanho integral, e polipeptídeos variantes que são
20 produzidos a partir de ácidos nucléicos mutagenizados especialmente desenhados para introduzir seqüências de aminoácidos em polipeptídeos dos melhoramentos. Em melhoramentos particulares, as seqüências de aminoácidos que são introduzidas nos polipeptídeos compreendem uma seqüência
25 que fornece um sítio de clivagem para uma enzima, como uma protease.

Sabe-se na arte que a atividade pesticida de toxinas *Bt* é normalmente ativada por clivagem do peptídeo no intestino do inseto por diferentes proteases. Uma vez que os peptídeos podem nem sempre ser clivados com total eficiência no

5 intestino do inseto, os fragmentos de uma toxina integral podem ter a atividade pesticida aumentada, em comparação com a toxina integral em si. Assim, alguns dos polipeptídeos dos melhoramentos incluem fragmentos de um polipeptídeo inseticida de tamanho integral, e alguns dos fragmentos do

10 polipeptídeo, variantes e mutações terão a atividade pesticida reforçada em relação à atividade do polipeptídeo inseticida naturalmente ocorrente a partir do qual estes são derivados, especialmente se o polipeptídeo inseticida naturalmente ocorrente não é ativado *in vitro* com uma

15 protease antes do rastreamento para atividade. Assim, o presente pedido abrange versões truncadas ou fragmentos das seqüências.

As mutações podem ser colocadas em qualquer seqüência

20 base, incluindo tais polipeptídeos truncados, enquanto o polipeptídeo mantém a atividade pesticida. Aquele com habilidade na arte pode facilmente comparar duas ou mais proteínas no que diz respeito à atividade pesticida, utilizando testes conhecidos na arte ou descritos neste

25 contrato. É preciso entender que os polipeptídeos dos melhoramentos podem ser produzidos tanto pela expressão de um

ácido nucléico divulgado aqui, ou pelo uso de técnicas padronizadas de biologia molecular.

É reconhecido que as proteínas pesticidas podem ser
5 oligoméricas e irão variar em peso molecular, número de
resíduos, componentes peptídeos, atividade contra uma
determinada praga, e outras características. No entanto,
segundo os métodos aqui previstos, proteínas ativas contra
uma variedade de pragas podem ser isoladas e caracterizadas.
10 As proteínas pesticidas dos melhoramentos podem ser usadas em
combinação com outras toxinas *Bt* ou outras proteínas
inseticidas para aumentar a faixa de insetos alvo. Além
disso, o uso das proteínas pesticidas dos melhoramentos em
combinação com outras toxinas inseticidas *Bt* ou outros
15 princípios inseticidas de uma natureza distinta tem
particular utilidade para a prevenção e/ou gestão de
resistência a insetos. Outros agentes inseticidas incluem
inibidores da protease (de ambos os tipos serina e cisteína),
 α -amilase e peroxidase.

20

Fragmentos e variantes de seqüências de nucleotídeo e de
aminoácidos e os polipeptídeos codificados, assim, também são
abrangidos pelos melhoramentos. Conforme utilizado aqui o
termo "fragmento" se refere a uma parte de uma seqüência de
25 nucleotídeos de um polinucleotídeo ou uma parte de uma
seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo dos
melhoramentos. Fragmentos de uma seqüência de nucleotídeos

podem codificar fragmentos de proteínas que mantêm a atividade biológica da proteína nativa ou de comprimento integral correspondente e, portanto, possuem atividade pesticida. Assim, reconhece-se que alguns dos
5 polinucleotídeos e seqüências de aminoácidos dos melhoramentos podem corretamente ser referidos a ambos os fragmentos e mutantes.

É preciso entender que o termo "fragmento", como ele é
10 usado para se referir a seqüências de ácido nucléico dos melhoramentos, abrange também as seqüências que são úteis como sondas de hibridização. Esta classe de seqüências de nucleotídeos geralmente não codifica fragmentos protéicos que retenham a atividade biológica. Assim, fragmentos de uma
15 seqüência de nucleotídeos podem variar de pelo menos cerca de 20 nucleotídeos, cerca de 50 nucleotídeos, cerca de 100 nucleotídeos, e até o tamanho completo da seqüência de nucleotídeos que codificam as proteínas dos melhoramentos.

20 Um fragmento de uma seqüência de nucleotídeos dos melhoramentos que codifica uma porção biologicamente ativa de uma proteína pesticida dos melhoramentos irá codificar, pelo menos, 15, 25, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100 ou 1.200 aminoácidos contíguos, ou até
25 o número total de aminoácidos presentes em um polipeptídeo pesticida dos melhoramentos (por exemplo, 670 aminoácidos para a SEQ ID NO: 2). Assim, entende-se que os melhoramentos

também englobam polipeptídeos que são fragmentos das proteínas pesticidas exemplares dos melhoramentos e tendo comprimentos de pelo menos 15, 25, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100 ou 1.200 aminoácidos contíguos, ou até o número total de aminoácidos presentes em um polipeptídeo pesticida dos melhoramentos (por exemplo, 670 aminoácidos para a SEQ ID Nos: 2). Os fragmentos de uma sequência de nucleotídeos dos melhoramentos que são úteis como sondas de hibridização ou iniciadores de PCR em geral, não precisam codificar uma porção biologicamente ativa de uma proteína pesticida. Assim, um fragmento de ácido nucléico das incorporações pode codificar uma porção biologicamente ativa de uma proteína pesticida, ou pode ser um fragmento que pode ser usado como uma sonda de hibridização ou iniciador de PCR utilizando-se métodos aqui divulgados. Uma porção biologicamente ativa de uma proteína pesticida pode ser obtida por isolamento de uma parte de uma das sequências de nucleotídeos dos melhoramentos, expressando a porção da proteína pesticida codificada (por exemplo, pela expressão de recombinação *in vitro*), e avaliando-se a atividade da porção da proteína pesticida codificada.

Os ácidos nucléicos que são fragmentos de uma sequência de nucleotídeos dos melhoramentos incluem pelo menos 16, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 1.000, 1.200, 1.400, 1.600, 1.800 ou 2.000 nucleotídeos, ou até o número de nucleotídeos presentes em

uma sequência de nucleotídeos aqui divulgada (por exemplo, 1.902 nucleotídeos para a SEQ ID NO: 1). Fragmentos de melhoramentos particulares vislumbrados a partir de (por exemplo, produzido a partir de) um primeiro ácido nucléico dos melhoramentos, onde o fragmento codifica uma toxina truncada caracterizada por atividade pesticida. Polipeptídeos truncados codificados pelos fragmentos de polinucleotídeos dos melhoramentos são caracterizados pela atividade pesticida que é equivalente a, ou melhorada, em relação à atividade do polipeptídeo integral correspondente codificado pelo primeiro ácido nucléico a partir do qual o fragmento é derivado. Prevê-se que tais fragmentos de ácido nucléico dos melhoramentos podem ser truncados na extremidade 3' da sequência de codificação nativa ou de tamanho integral correspondente. Fragmentos de ácidos nucléicos também podem ser truncados, tanto a 5' quanto no final 3' da sequência de codificação nativa ou de comprimento integral correspondente.

O termo "variantes" é aqui utilizado para se referir a sequências muito semelhantes. Para as sequências de nucleotídeos, variantes conservadas incluem as sequências que, por causa da degeneração do código genético, codificam a sequência de aminoácidos de um dos polipeptídeos pesticidas dos melhoramentos. Variantes alélicas como estas que ocorrem naturalmente podem ser identificadas com o uso de técnicas conhecidas de biologia molecular, como, por exemplo, a reação

em cadeia da polimerase (PCR) e técnicas de hibridização, conforme aqui descrito.

As sequências de nucleotídeos variantes também incluem
5 sequências de nucleotídeos sinteticamente derivadas, como as
geradas, por exemplo, usando-se mutagênese sítio-dirigida,
mas que ainda codificam uma proteína pesticida dos
melhoramentos, como uma toxina mutante. Geralmente, as
variantes de uma sequência de nucleotídeos específica dos
10 melhoramentos terão pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%,
86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,
98%, 99%, ou mais de identidade de sequência a estas
sequências de nucleotídeos em particular conforme determinado
por programas de alinhamento de sequência descritos no
15 presente documento utilizando-se parâmetros predefinidos. A
variante de uma sequência de nucleotídeos dos melhoramentos
pode diferir desta sequência por apenas 1-15 nucleotídeos,
por apenas: 1-10, tais como, 6-10, ou somente 5, somente 4,
3, 2, ou mesmo 1 nucleotídeo.

20

As variantes de uma sequência de nucleotídeos específica
dos melhoramentos (ou seja, uma sequência de nucleotídeos
exemplar) também podem ser avaliadas através da comparação do
percentual de identidade de sequência entre o polipeptídeo
25 codificado por uma sequência de nucleotídeos variante e o
polipeptídeo codificado pela sequência de nucleotídeos de
referência. Assim, por exemplo, ácidos nucleicos isolados que

codificam um polipeptídeo com um dado percentual de identidade de sequência ao polipeptídeo de SEQ ID NO: 2 são divulgados. O percentual de identidade de sequência entre dois polipeptídeos pode ser calculado usando-se programas de alinhamento da sequência descritos aqui e utilizando-se parâmetros predefinidos. Sempre que um dado par de polinucleotídeos dos melhoramentos é avaliado por comparação do percentual de identidade de sequência partilhada pelos dois polipeptídeos que eles codificam, o percentual de identidade de sequência entre os dois polipeptídeos codificados é de, pelo menos, cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, geralmente, pelo menos, cerca de 75%, 80%, 85%, pelo menos, cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou pelo menos cerca de 98%, 99% ou mais identidade de sequência.

Conforme aqui utilizado, o termo "proteína variante" engloba polipeptídeos que são derivados de uma proteína nativa por: exclusão (o chamado truncamento) ou adição de um ou mais aminoácidos na porção N- terminal e/ou C-terminal da proteína nativa, supressão ou adição de um ou mais aminoácidos em um ou mais sítios na proteína nativa, ou a substituição de um ou mais aminoácidos em um ou mais sítios na proteína nativa. Assim, o termo "proteína variante" engloba fragmentos biologicamente ativos de uma proteína nativa que compreendem um número suficiente de resíduos de aminoácidos contíguos para se manter a atividade biológica da

proteína nativa, ou seja, para se ter atividade pesticida. Tal atividade pesticida pode ser diferente ou melhorada em relação à proteína nativa ou pode ser inalterada, enquanto a atividade pesticida é mantida.

5

As proteínas variantes englobadas pelos melhoramentos são biologicamente ativas, isto é, elas continuam a possuir a atividade biológica desejada da proteína nativa, que é a atividade como pesticida, como aqui descrito. Tais variações
10 podem resultar a partir de, por exemplo, polimorfismo genético ou manipulação humana. Variantes biologicamente ativas de uma proteína pesticida nativa dos melhoramentos terão pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,
15 99%, ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da proteína nativa, como determinado pelos programas de alinhamento da sequência descritos aqui e usando-se parâmetros padronizados. Uma variante biologicamente ativa da proteína dos melhoramentos pode
20 diferir da proteína por somente 1-15 resíduos de aminoácidos, por somente: 1-10, tais como, 6-10, somente 5, somente 4, 3 , 2 ou mesmo 1 resíduo de aminoácido.

Os melhoramentos ainda englobam um microorganismo que é
25 transformado com pelo menos um ácido nucléico dos melhoramentos, com um cassete de expressão compreendendo o ácido nucléico, ou com um vetor que inclui o cassete de

expressão. Em alguns melhoramentos, o microorganismo é aquele que se multiplica em plantas. Um melhoramento da invenção refere-se a uma proteína pesticida encapsulada que compreende um microorganismo transformado capaz de expressar, pelo
5 menos, uma proteína pesticida dos melhoramentos.

Os melhoramentos fornecem composições pesticidas compreendendo um microorganismo transformado dos melhoramentos. Em tais melhoramentos, o microorganismo
10 transformado é geralmente presente na composição de pesticidas em uma quantidade de eficácia pesticida, juntamente com um carreador adequado. Os melhoramentos abrangem também composições pesticidas compreendendo uma proteína isolada dos melhoramentos, isoladamente ou em
15 combinação com um organismo transformado dos melhoramentos e/ou uma proteína pesticida encapsulada dos melhoramentos, em uma quantidade de eficácia inseticida, juntamente com um carreador adequado.

20 Os melhoramentos prevêm ainda um método de aumentar a gama de insetos-alvo, usando-se uma proteína pesticida dos melhoramentos em combinação com, pelo menos, uma outra ou "segunda" proteína pesticida. Qualquer proteína pesticida conhecida na arte pode ser empregada nos métodos dos
25 melhoramentos. Essas proteínas pesticidas incluem, mas não estão limitadas a, toxinas *Bt*, inibidores da protease, α -amilases e peroxidases.

Os melhoramentos também englobam plantas transformadas ou transgênicas compreendendo pelo menos uma sequência de nucleotídeos dos melhoramentos. Em alguns melhoramentos, a
5 planta é estavelmente transformada com um construto de nucleotídeo compreendendo pelo menos, uma sequência de nucleotídeos dos melhoramentos operacionalmente ligada a um promotor que dirige a expressão em uma célula vegetal. Como aqui utilizado, a expressão "planta transformada" e "plantas
10 transgênicas" referem-se a uma planta que compreende dentro do seu genoma um polinucleotídeo heterólogo. Geralmente, o polinucleotídeo heterólogo é estavelmente integrado no genoma de uma planta transgênica ou transformado, de modo que o polinucleotídeo é transmitido às gerações sucessivas. O
15 polinucleotídeo heterólogo pode ser integrado no genoma sozinho ou como parte de um cassete de expressão recombinante.

É preciso entender que o termo "transgênico" utilizado
20 aqui inclui qualquer célula, linhagem celular, calo, tecido, parte da planta, ou planta da qual o genótipo foi alterado pela presença de um ácido nucléico heterólogo, incluindo os transgênicos inicialmente tão alterados bem como aqueles criados por cruzamentos sexuais ou propagação assexuada do
25 transgênico inicial. O termo "transgênico", usado aqui, não abrange a alteração do genoma (cromossômicas ou extra-cromossômicas) por métodos convencionais de melhoramento de

plantas que ocorrem naturalmente ou por eventos como a fecundação cruzada aleatória, infecção viral não-recombinante, transformação bacteriana não-recombinante, transposição não-recombinante, ou uma mutação espontânea.

5

Conforme utilizado aqui, o termo "planta" inclui a planta inteira e órgãos vegetais (por exemplo, folhas, caules, raízes, etc), sementes, células vegetais e descendentes dos mesmos. Partes de plantas transgênicas estão dentro do escopo dos melhoramentos e incluem, por exemplo, as células vegetais, protoplastos, tecidos, calos, embriões, bem como flores, caules, frutos, folhas e raízes originárias de plantas transgênicas ou de seus descendentes previamente transformados com uma molécula de DNA dos melhoramentos e, portanto, constituído pelo menos em parte de células transgênicas.

Como utilizado aqui, o termo planta inclui células vegetais, protoplastos de plantas, culturas de células do tecido vegetal a partir do qual as plantas podem ser regeneradas, calos de plantas, touceiras de plantas e células vegetais que estão intactas em plantas ou partes de plantas, como os embriões, pólen, óvulos, sementes, folhas, flores, ramos, frutos, caroços, orelhas, espigas, as cascas, caules, raízes, pontas de raízes, anteras, e assim por diante. A classe de plantas que pode ser utilizada nos métodos dos melhoramentos geralmente é tão ampla quanto a classe de

plantas superiores passíveis de técnicas de transformação, incluindo as plantas de ambas as monocotiledôneas e dicotiledôneas. Tais plantas incluem, por exemplo, *Solanum tuberosum* e *Zea mays*.

5

Enquanto os melhoramentos não dependem de um mecanismo biológico em particular para aumentar a resistência de uma planta a uma praga de planta, a expressão das seqüências de nucleotídeos dos melhoramentos em uma planta pode resultar na
10 produção das proteínas pesticidas dos melhoramentos e num aumento na resistência da planta a uma praga de plantas. Encontra-se uso para as plantas dos melhoramentos na agricultura, em métodos para impactar as pragas de insetos. Determinados melhoramentos fornecem plantas de cultivo
15 transformadas, como, por exemplo, plantas de milho, que são úteis em métodos para impactar as pragas da planta, como, por exemplo, a broca-do-milho-europeu.

Uma "planta ou célula vegetal submetida" é uma na qual
20 tenha sido realizada alteração genética, como transformação, em um gene de interesse, ou é uma planta ou célula de planta, que é descendente de uma planta ou célula de planta alterada e que compreende as alterações. Um "controle" ou "unidade de controle" ou "célula vegetal controle" fornece um ponto de
25 referência para se medir as mudanças fenotípicas da planta ou célula vegetal submetida.

A planta ou célula vegetal controle pode incluir, por exemplo: (a) uma planta ou célula do tipo selvagem, que seja do mesmo genótipo do material de partida para a alteração genética que resultou na planta ou célula vegetal sujeita,

5 (b) um planta ou célula de planta de mesmo genótipo do material de partida, mas que foi transformada com a construção de um nulo (isto é, com uma construção que não tem qualquer efeito sobre a característica de interesse, como uma construção que compreende um gene marcador), (c) uma planta

10 ou célula vegetal, que é um segregante não-transformado entre a progênie de uma planta ou célula vegetal submetida, (d) uma planta ou célula vegetal geneticamente idêntica à planta de ou de células vegetal submetida, mas que não seja exposta a condições ou estímulos que induziriam a expressão do gene de

15 interesse, ou (e) a planta ou de células vegetal em si, mas em condições em que o gene de interesse não é expresso.

Aqueles com habilidade na arte prontamente reconhecem que os avanços no campo da biologia molecular, tais como

20 mutagênese sítio-específicas e aleatórias, metodologias de reação em cadeia da polimerase e técnicas de engenharia de proteínas fornecem uma extensa coleção de ferramentas e protocolos apropriados para uso para alteração ou modificação tanto da sequência de aminoácidos quanto as sequências

25 genéticas subjacentes para proteínas de interesse agrícola.

Assim, as proteínas dos melhoramentos podem ser alteradas de várias maneiras, incluindo substituições de aminoácidos, exclusões, truncamentos, e inserções. Métodos de tais manipulações são geralmente conhecidas na arte. Por exemplo, variantes de seqüência de aminoácidos das proteínas
5 pesticidas podem ser preparadas através da introdução de mutações em um ácido nucléico sintético (por exemplo, uma molécula de DNA). Métodos de mutagênese e alterações de ácido nucléico são bem conhecidos na arte. Por exemplo, as
10 alterações projetadas podem ser introduzidas usando-se uma técnica de mutagênese sítio-dirigida mediada por oligonucleotídeo. Veja, por exemplo, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; U.S. Patent No. 4,873,192; Walker e
15 Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York), e as referências aí citadas.

As seqüências de nucleotídeos mutagenizados dos melhoramentos podem ser modificadas de modo a alterar cerca
20 de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 ou mais dos aminoácidos presentes na seqüência primária do polipeptídeo codificado. Alternativamente, ainda mais mudanças podem ser introduzidas a partir da seqüência nativa de forma que a proteína codificada pode ter, ao menos, cerca de 1% ou 2%, ou cerca de
25 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, ou até mesmo cerca de 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, ou 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, ou 25%, 30%, 35%, ou 40% ou mais dos códons alterados,

modificados ou não, em comparação com a proteína do tipo-selvagem correspondente. Da mesma forma, a proteína codificada pode ter menos de 1% ou 2%, ou cerca de 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, ou até mesmo cerca de 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, ou 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, ou 25%, 30%, 35% , ou 40% ou mais códons adicionais em comparação com a proteína tipo-selvagem correspondente. Deve ser entendido que as seqüências de nucleotídeos mutagenizados dos melhoramentos visam abranger peptídeos equivalentes e biologicamente funcionais, que têm atividade pesticida, tais como uma atividade pesticida melhorada, conforme determinado por propriedades anti-alimentares contra a larva da lagarta-do-cartucho-de-outono. Tais seqüências podem surgir como consequência da redundância de códon e equivalência funcional que são conhecidas por ocorrer naturalmente dentro de seqüências de ácidos nucléicos e das proteínas assim codificadas.

Aquele com habilidades na arte seria capaz de reconhecer que as adições de aminoácidos e/ou substituições são geralmente embasadas na similaridade relativa da cadeia lateral do aminoácido-substituente, por exemplo, sua hidrofobicidade, carga, tamanho, e assim por diante. Grupos de substituição de aminoácidos exemplares que tomam várias das características precedentes em consideração são bem conhecidos para aqueles com habilidade na arte e incluem:

arginina e lisina; glutamato e aspartato, serina e treonina, glutamina e asparagina e valina, leucina e isoleucina.

Orientações quanto às substituições de aminoácidos
5 adequadas que não afetam a atividade biológica da proteína de
interesse podem ser encontradas no modelo de Dayhoff et al.
(1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed.
Res. Found., Washington, D.C.), aqui incorporado pela
referência. Substituições conservadas, como a troca de um
10 aminoácido por outro de propriedades semelhantes, podem ser
feitas.

Assim, os genes e as seqüências de nucleotídeos dos
melhoramentos incluem tanto as seqüências que ocorrem
15 naturalmente e formas mutantes. Da mesma forma, as proteínas
dos melhoramentos abrangem tanto as proteínas naturais e
formas variantes (por exemplo, os polipeptídeos truncados) e
modificadas (por exemplo, mutante) desta. Essas variantes
continuam a possuir a atividade pesticida desejada.
20 Obviamente, as mutações que serão feitas na seqüência de
nucleotídeos que codifica a variação não devem colocar a
seqüência fora do quadros de leitura e, geralmente, não vão
criar regiões complementares que poderiam produzir estrutura
secundária do mRNA. Veja, EP Patent Application Publication
25 No. 75.444.

Não se espera que as deleções, inserções e substituições das seqüências de proteína aqui englobadas produzam mudanças radicais nas características das proteínas. No entanto, quando é difícil se prever o efeito exato da substituição, exclusão ou inserção antes de fazê-lo, um profissional do ramo compreenderá que o efeito será avaliado por testes de rastreio de rotina, como ensaios de alimentação de inseto. Veja, por exemplo, Marrone *et al.* (1985) *J. Econ. Entomol.* 78: 290-293 e Czapla e Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485, aqui incorporados pela referência.

Seqüências de nucleotídeos variantes e proteínas também englobam seqüências e proteínas derivadas de um processo mutagênico e recombinogênico como embaralhamento de DNA. Com tal procedimento, uma ou mais seqüências de codificação diferentes podem ser manipuladas para se criar uma nova proteína pesticida, possuindo as propriedades desejadas. Desta forma, bibliotecas de polinucleotídeos recombinantes são geradas a partir de uma população de seqüências de polinucleotídeos relacionados compreendendo regiões de seqüência que têm identidade de seqüência substancial e podem ser recombinadas por homologia *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, usando esta abordagem, seqüências de codificação integrais, motivos de seqüência de codificação de um domínio de interesse, ou qualquer fragmento de uma seqüência de nucleotídeos dos melhoramentos podem ser embaralhadas entre as seqüências de nucleotídeos dos melhoramentos e as porções

correspondentes das outras seqüências de nucleotídeos Cry conhecidas para se obter um novo gene que codifica para uma proteína com uma propriedade de interesse melhorada.

5 Propriedades de interesse incluem, mas não estão limitadas a, atividade de pesticidas por unidade de proteína pesticida, a estabilidade da proteína, e a toxicidade para espécies não-alvo, em especial os seres humanos, animais, plantas e microorganismos que expressam os polipeptídeos

10 pesticidas dos melhoramentos. Os melhoramentos não estão vinculados a uma estratégia de embaralhamento particular, só que pelo menos uma seqüência de nucleotídeos dos melhoramentos, ou parte dela, está envolvida numa estratégia de embaralhamento. O embaralhamento pode envolver apenas as

15 seqüências de nucleotídeos aqui divulgadas ou pode incluir, adicionalmente, embaralhamento de outras seqüências de nucleotídeos conhecidas na arte. Estratégias para o embaralhamento de DNA são conhecidas na arte. Veja, por exemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-

20 10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) *Nature* 391:288-291; e U.S. Patent Nos. 5,605,793 e 5,837,458.

25

As seqüências de nucleotídeos dos melhoramentos também podem ser usadas para se isolar as seqüências correspondentes

de outros organismos, especialmente outras bactérias, e mais particularmente outras linhagens de *Bacillus*. Desta forma, métodos como PCR, hibridização e similares podem ser usados para se identificar tais seqüências com base em sua homologia de seqüência com as seqüências aqui enunciadas. Seqüências que são selecionados com base em sua identidade de seqüência para as seqüências inteiras aqui enunciadas ou fragmentos destas não são abrangidos pelos melhoramentos. Tais seqüências incluem seqüências que são ortólogos das seqüências divulgadas. O termo "ortólogos" refere-se aos genes derivados de um gene ancestral comum e que são encontrados em diferentes espécies, como resultado de especiação. Genes encontrados em diferentes espécies são considerados ortólogos quando suas seqüências de nucleotídeos e/ou suas seqüências codificadoras de proteína partilham identidade substancial, tal como definido no presente trabalho. As funções dos ortólogos são normalmente altamente conservadas entre as espécies.

Em uma abordagem de PCR, iniciadores de oligonucleotídeos podem ser projetados para o uso em reações de PCR para amplificar seqüências de DNA correspondentes a partir de cDNA ou de DNA genômico extraído de qualquer organismo de interesse. Métodos para a concepção de iniciadores de PCR e para clonagem por PCR são geralmente conhecidos na arte e são divulgados em Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a ed., Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Plainview, Nova York), denominado a seguir como "Sambrook". Veja também Innis *et al.*, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis e Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); e Innis e Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Os métodos conhecidos de PCR incluem, mas não estão limitados a, métodos utilizando iniciadores pareados, iniciadores aninhados (*nested*), iniciadores específicos únicos, iniciadores degenerados, iniciadores gene específicos, iniciadores vetor específicos, iniciadores parcialmente incompatíveis, e assim por diante.

Nas técnicas de hibridização, a totalidade ou uma parte de uma sequência de nucleotídeos conhecida é usada como uma sonda que, seletivamente, hibridiza a outras sequências de nucleotídeos correspondentes e presentes em uma população de fragmentos de DNA genômico clonados ou fragmentos de cDNA (ou seja, bibliotecas genômicas ou de cDNA) de um organismo escolhido. As sondas de hibridização podem ser fragmentos de DNA genômico, fragmentos de cDNA, fragmentos de RNA ou outros oligonucleotídeos, e pode ser rotulados com um grupo detectável como ^{32}P ou qualquer outro marcador detectável. Assim, por exemplo, as sondas de hibridização podem ser feitas através da marcação de oligonucleotídeos sintéticos baseados nas sequências dos melhoramentos. Métodos de preparação de sondas para hibridização e para a construção de

bibliotecas de cDNA e genômicas são geralmente conhecidos na arte e são divulgados no Sambrook.

Por exemplo, uma seqüência integral aqui divulgada, ou
5 uma ou mais partes dela, pode ser usada como uma sonda capaz
de hibridizar especificamente com as seqüências e RNA
mensageiro correspondentes. Para se realizar a hibridação
específica sob uma variedade de condições, tais sondas
incluem seqüências que são únicas para as seqüências dos
10 melhoramentos e são geralmente, pelo menos, entre cerca de 10
ou 20 nucleotídeos de comprimento. Essas sondas podem ser
utilizadas para amplificar seqüências Cry correspondentes a
partir de um organismo escolhido por PCR. Esta técnica pode
ser usada para se isolar seqüências de codificação de um
15 organismo desejado ou como um teste de diagnóstico para se
determinar a presença de seqüências de codificação em um
organismo. Técnicas de hibridização incluem rastreamento por
hibridização de bibliotecas de DNA plaqueadas (tanto placas
ou colônias; ver, por exemplo, Sambrook).

20

As hibridações destas seqüências podem ser realizadas em
condições estringentes. O termo "condições estringentes" ou
"condições estringentes de hibridação", usado aqui se refere
a condições na qual uma sonda irá hibridizar com a sua
25 seqüência alvo a um grau detectável maior do que a outras
seqüências (por exemplo, pelo menos 2 vezes, 5 vezes, ou 10
vezes acima da base). Condições estringentes são dependentes

da sequência e serão diferentes em diferentes circunstâncias. Ao controlar a estringência da hibridação e/ou as condições de lavagem, grupos-alvo que são 100% complementares a sonda podem ser identificados (marcação ou sondagem de homólogos).

- 5 Alternativamente, as condições de estringência podem ser ajustadas para permitir alguns pareamentos errôneos entre as sequências para que menores graus de similaridade sejam detectados (marcação ou sondagem heteróloga). Geralmente, uma sonda é inferior a cerca de 1000 ou 500 nucleotídeos em comprimento.
- 10

- Normalmente, as condições restritivas serão aquelas em que a concentração de sal é inferior a cerca de 1,5 M de íons de Na, tipicamente entre cerca de 0,01 a 1,0 M de concentração de íons Na (ou outros sais) em pH 7,0 para 8,3 e a temperatura é de pelo menos cerca de 30°C para sondas de curtas (por exemplo, 10 a 50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60°C para sondas de longas (por exemplo, superior a 50 nucleotídeos). Condições de alta estringência também podem ser alcançadas com a adição de agentes desestabilizadores, tais como formamida. Condições de baixa estringência exemplares incluem a hibridação com uma solução tampão de formamida 30 a 35%, 1 M de NaCl, 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 37°C, e uma lavagem em 1X a 2X SSC (20X SSC = 3,0 M NaCl/0,3 M citrato trissódico) a 50 até 55°C. Condições de estringência moderada exemplares incluem a hibridação em 40 a 45% de formamida, 1,0 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C, e uma
- 15
- 20
- 25

lavagem em 0.5X a 1X SSC em 55 a 60°C. Condições de alta estringência exemplares incluem a hibridação em 50% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C, e uma lavagem final em 0.1X SSC a 60 até 65°C durante pelo menos 20 minutos.

5 Opcionalmente, tampões de lavagem podem incluir cerca de 0,1% para cerca de 1% de SDS. A duração da hibridação é geralmente inferior a cerca de 24 horas, normalmente cerca de 4 a cerca de 12 horas.

10 A especificidade é tipicamente a função das lavagens pós-hibridização, sendo os fatores críticos a força iônica e temperatura da solução de lavagem final. Para os híbridos DNA-DNA, a T_m (ponto ou temperatura de fusão térmica) pode ser aproximada a partir da equação de Meinkoth e Wahl (1984)

15 *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\% \text{ de forma}) - 500/L$, onde M é a molaridade de cátions monovalentes, % GC é a porcentagem de nucleotídeos guanina e citosina no DNA, "% de forma" é a porcentagem de formamida na solução de hibridação, e L é o comprimento do

20 híbrido em pares de bases. A T_m é a temperatura (sob força iônica e pH definidos), na qual 50% de uma sequência alvo complementar hibridiza com uma sonda perfeitamente alinhada. As lavagens normalmente são realizadas pelo menos até que o equilíbrio seja alcançado e um baixo nível de ruído da

25 hibridação é alcançado, como, por 2 horas, 1 hora ou 30 minutos.

A T_m é reduzida em cerca de 1°C para cada 1% de pareamento errôneo, assim, a T_m , a hibridação e/ou as condições de lavagem podem ser ajustadas para a hibridização com sequências de identidade desejada. Por exemplo, se as

5 sequências com mais de 90% de identidade são procuradas, a T_m pode ser reduzida em 10°C . Geralmente, as condições restritivas são selecionadas para serem cerca de 5°C mais baixas do que a T_m para a sequência específica e seu complemento em uma força iônica e pH definidos. No entanto,

10 condições extremamente rigorosas podem utilizar uma hibridação e/ou lavagem a 1, 2, 3 ou 4°C mais baixa do que o T_m ; condições moderadamente severas podem utilizar uma hibridação e/ou lavagem a 6, 7, 8, 9 ou 10°C mais baixa do que o T_m ; e condições de baixa estringência podem utilizar

15 uma hibridação e/ou lavagem a 11, 12, 13, 14, 15 ou 20°C mais baixa do que a T_m .

Usando-se a equação, composições de hibridação e de lavagem, e T_m desejada, aqueles com habilidades ordinárias

20 irão entender que as variações na estringência de hibridação e/ou das soluções de lavagem são inerentemente descritas. Se o grau desejado de pareamento errôneo resulte em uma T_m inferior a 45°C (solução aquosa) ou 32°C (solução de formamida), a concentração do SSC pode ser aumentada de modo

25 que uma temperatura mais alta possa ser usada. Um extenso guia para a hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and*

Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, New York); e Ausubel *et al.*, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Veja também Sambrook. Assim, grupos isolados que codificam uma proteína Cry dos melhoramentos e hibridizam sob condições severas nas seqüências Cry divulgadas aqui, ou a fragmentos destas, não são abrangidos pelos melhoramentos.

10 Os termos a seguir são usados para descrever as relações entre as seqüências de dois ou mais ácidos nucléicos ou polinucleotídeos: (a) "seqüência referência", (b) "janela de comparação", (c) "identidade de seqüência", (d) "percentagem de identidade de seqüência", e (e) "identidade substancial".

15

(a) Como usado aqui, "seqüência referência" é uma seqüência definida usada como uma base para comparação de seqüência. Uma seqüência referência pode ser um subconjunto ou a totalidade de uma seqüência específica, por exemplo, como um segmento de um cDNA ou seqüência gênica de tamanho integral, ou o cDNA ou seqüência gênica completos.

20

(b) Como usado aqui, "janela de comparação" faz referência a um segmento contíguo e específico de uma seqüência de nucleotídeos, em que a seqüência de nucleotídeos na janela de comparação pode incluir acréscimos ou supressões (ou seja, lacunas) em relação à seqüência referência (que não

25

contém os acréscimos ou supressões) para o melhor alinhamento das duas seqüências. Geralmente, a janela de comparação é pelo menos de 20 nucleotídeos contíguos em comprimento, e, opcionalmente, pode ser de 30, 40, 50, 100, ou mais. Aqueles com habilidade na arte entenderão que, para se evitar uma alta similaridade a uma seqüência referência devido à inclusão de lacunas na seqüência polinucleotídeo, uma penalidade de lacuna (*gap penalty*) geralmente é introduzida e é subtraída do número de casamentos ou alinhamentos.

10

Métodos de alinhamento de seqüências para comparação são bem conhecidos na arte. Assim, a determinação do percentual de identidade de seqüência entre as duas seqüências pode ser feita usando-se um algoritmo matemático. Exemplos não-limitantes de tais algoritmos matemáticos são o algoritmo de Myers e Miller (1988) *CABIOS* 4: 11-17; o algoritmo de alinhamento local de Smith *et al.* (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482; o algoritmo de alinhamento global de Needleman e Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453; o método de procura-por-alinhamento local de Pearson e Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 2444-2448; o algoritmo de Karlin e Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 872264, alterado em Karlin e Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 90: 5873-5877.

25

Implementações computacionais destes algoritmos matemáticos podem ser utilizadas para a comparação de

seqüências para se determinar a identidade de seqüência. Tais implementações incluem, mas não estão limitadas a: CLUSTAL no programa PC/Gene (disponível pela Intelligenetics, Mountain View, Califórnia), o programa ALIGN (versão 2.0) e GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA e TFASTA no pacote GCG *Wisconsin Genetics Software Package*, Versão 10 (disponível pela Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, Califórnia, USA). Alinhamentos usando esses programas podem ser feitos usando-se os parâmetros padronizados. O programa CLUSTAL é bem descrito por Higgins et al. (1988) *Gene* 73:237-244 (1988), Higgins et al. (1989) *CABIOS* 5:151-153; Corpet et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang et al. (1992) *CABIOS* 8:155-65; e Pearson et al. (1994) *Meth. Mol. Biol.* 24:307-331. O programa ALIGN é baseado no algoritmo de Myers e Miller (1988) *supra*. Uma tabela de peso de resíduo PAM120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12, e uma penalidade de lacuna de 4 podem ser usados com o programa ALIGN quando se compara seqüências de aminoácidos. Os programas BLAST de Altschul et al (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403 é baseado no algoritmo de Karlin e Altschul (1990) *supra*. Pesquisas de nucleotídeos no BLAST podem ser realizadas com o programa blastn, pontuação (score)= 100, tamanho de palavra (wordlength) = 12, para se obter as seqüências de nucleotídeos homólogos para uma seqüência de nucleotídeos que codifica uma proteína dos melhoramentos. Pesquisas de proteína no BLAST podem ser realizadas com o programa BLASTX, pontuação = 50, tamanho de palavra = 3, para

se obter seqüências de aminoácidos homólogas a uma proteína ou polipeptídeo dos melhoramentos. Para se obter alinhamentos com lacunas para fins de comparação, *Gapped* BLAST (em BLAST 2,0) pode ser utilizado como descrito no Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternativamente, o PSI-BLAST (no BLAST 2.0) pode ser usado para se executar uma busca reiterativa que detecta as relações distantes entre moléculas. Veja Altschul et al. (1997) *supra*. Quando se está utilizando o BLAST, *Gapped* BLAST, ou PSI-BLAST, os parâmetros padrão dos respectivos programas (por exemplo, *blastn* para seqüências de nucleotídeos, *BLASTX* de proteínas) podem ser usados. Veja o endereço eletrônico da *National Center for Biotechnology Information* na *world wide web* em *ncbi.nlm.nih.gov*. O alinhamento também pode ser realizado manualmente por inspeção.

Salvo disposição contrária, a identidade de seqüência/similaridade contidas neste documento refere-se ao valor obtido utilizando-se GAP versão 10 utilizando os seguintes parâmetros: % de identidade e % de semelhança para uma seqüência de nucleotídeos utilizando Peso de Lacuna (*GAP Weight*) de 50 e Peso de Comprimento (*Length Weight*) de 3, e a matriz de pontuação *nwsgapdna.cmp*; % de identidade e % de semelhança para uma seqüência de aminoácidos usando-se Peso de Lacuna de 8 e Peso de Comprimento de 2, e a matriz de pontuação *BLOSUM62*, ou qualquer outro programa equivalente. O termo "programa equivalente", usado aqui se refere a qualquer

programa de comparação de seqüência que, para quaisquer duas seqüências em questão, gera um alinhamento tendo casamento de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos idênticos e um percentual de identidade de seqüência idêntico quando comparado com o alinhamento correspondente gerado pelo GAP Versão 10.

O GAP utiliza o algoritmo de Needleman e Wunsch (1970) *supra*, para encontrar o alinhamento de duas seqüências completas que maximiza o número de igualdades e minimiza o número de lacunas. O GAP considera todos os possíveis alinhamentos e posições de lacuna e cria o alinhamento com o maior número de bases e o menor número de lacunas correspondente. Ele permite a prestação de uma penalidade de criação de lacuna e uma penalidade de extensão de lacuna em unidades de bases alinhadas. O GAP deve fazer um lucro do número de penalidade de criação de lacuna por alinhamento para cada lacuna que insere. Se uma penalidade de extensão de lacuna maior que zero é escolhida, o GAP deve, além disso, fazer um lucro para cada lacuna inserida do tamanho do tempo da lacuna e da penalidade de extensão de lacuna. Valores de criação de penalidade de lacuna padronizados e valores de penalidade de extensão de lacuna na versão 10 do pacote GCG Wisconsin Genetics Software Package para seqüências protéicas são de 8 e 2, respectivamente. Para seqüências de nucleotídeos o padrão de penalidade de criação de lacuna é de 50, enquanto o padrão de penalidade de extensão de lacuna é

3. A criação de lacuna e penalidade de extensão de lacuna pode ser expressa como um número inteiro selecionado do grupo composto de números inteiros de 0 a 200. Assim, por exemplo, a criação de lacuna e penalidade de extensão de lacuna pode
5 ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ou superior.

O GAP apresenta um membro da família dos melhores alinhamentos. Pode haver muitos membros desta família, mas
10 nenhum outro membro tem uma qualidade melhor. O GAP mostra quatro figuras de mérito para alinhamentos: Qualidade, Relação, Identidade e semelhança. A qualidade é a métrica maximizada com a finalidade de alinhar as seqüências. A razão é a qualidade, dividido pelo número de bases no segmento mais
15 curto. A porcentagem de identidade é a porcentagem dos símbolos que realmente correspondem. A similaridade percentual é a porcentagem dos símbolos que são semelhantes. Os símbolos que estão sobre as lacunas são ignorados. A semelhança é marcada quando o valor Matriz de pontuação para
20 um par de símbolos é maior ou igual a 0,50, o limiar de similaridade. A matriz de pontuação utilizada na versão 10 do pacote *GCG Wisconsin Genetics Software Package* é BLOSUM62 (ver Henikoff e Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. E.U.A.* 89:10915).

25

(c) Como usado aqui, "identidade de seqüência" ou "identidade" no contexto de duas seqüências de ácido nucléico

ou de polipeptídeos faz referência aos resíduos nas duas seqüências que são os mesmos quando alinhados para correspondência máxima sobre uma janela de comparação especificada. Quando o percentual de identidade de seqüência é usado em referência às proteínas, é reconhecido que as posições de resíduos que não são idênticas, muitas vezes diferem por substituições de aminoácidos conservados, onde os resíduos de aminoácidos são substituídos por outros resíduos de aminoácidos com propriedades químicas semelhantes (por exemplo, carga ou hidrofobicidade) e, portanto, não alteram as propriedades funcionais da molécula. Quando as seqüências diferem em substituições conservadas, o percentual de identidade de seqüência pode ser ajustado para corrigir para a natureza conservadora da substituição. Seqüências que diferem por tais substituições conservadas são ditas como tendo "similaridade de seqüência" ou "similaridade". Os meios para se fazer este ajuste são bem conhecidos por aqueles com habilidade na arte. Normalmente, isso envolve pontuar-se uma substituição conservada como uma discordância parcial, ao invés de um pareamento completamente errôneo, aumentando-se assim o percentual de identidade de seqüência. Assim, por exemplo, onde a pontuação de 1 é dada a um aminoácido idêntico e, a uma substituição não-conservada é atribuída a pontuação de zero, a uma substituição conservadora é atribuída uma pontuação entre zero e 1. A pontuação de substituições conservadas é calculada, por exemplo, como implementado no

programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, Califórnia).

(d) Como usado aqui, "percentual de identidade de
5 sequência", significa o valor determinado através da
comparação de duas seqüências perfeitamente alinhadas sobre
uma janela de comparação, em que a parte da seqüência de
nucleotídeos na janela de comparação pode incluir acréscimos
ou supressões (ou seja, as lacunas) conforme comparada com a
10 sequência de referência (que não inclui os acréscimos ou
supressões) para o melhor alinhamento das duas seqüências. A
porcentagem é calculada pela determinação do número de
posições nas quais uma base de ácido nucléico ou resíduo de
aminoácidos idêntico ocorre em ambas às seqüências para gerar
15 o número de posições pareadas, dividindo o número de posições
pareadas pelo número total de posições na janela de
comparação, e multiplicando o resultado por 100 para render o
percentual de identidade de seqüência.

20 (e) (i) O termo "identidade substancial" de seqüências
de nucleotídeos significa um polinucleotídeo compreendendo
uma seqüência que tenha pelo menos 70%. 80%, 90%, ou 95% ou
mais de identidade de seqüência quando comparado a uma
seqüência de referência usando-se um dos programas de
25 alinhamento descritos e usando-se parâmetros padronizados.
Aqueles com habilidade na arte vão reconhecer que estes
valores podem ser devidamente ajustados para determinação da

identidade correspondente das proteínas codificadas por duas seqüências de nucleotídeos, tendo em conta a degenerescência do códon, a similaridade de aminoácidos, o posicionamento de quadro de leitura, e afins. A identidade substancial das
5 seqüências de aminoácidos para esses fins geralmente significa identidade de seqüência de pelo menos 60%, 70%, 80%, 90%, ou 95% ou mais de identidade de seqüência.

Outro indício de que as seqüências de nucleotídeos são
10 substancialmente idênticas é se as duas moléculas hibridizam uma com a outra em condições de alta estringência. Geralmente, condições de estringência são selecionadas para serem em torno de 5°C mais baixas do que a T_m para a seqüência específica sob uma força iônica e pH definidos. No
15 entanto, as condições de estringência abrangem as temperaturas na faixa de cerca de 1°C a cerca de 20°C mais baixas do que a T_m , dependendo do grau de estringência desejado, conforme de outra forma aqui qualificado. Os ácidos
nucléicos que não hibridizam uns com os outros em condições
20 de alta estringência são ainda substancialmente idênticos, se os polipeptídeos que eles codificam são substancialmente idênticos. Isto pode ocorrer, por exemplo, quando uma cópia de um ácido nucléico é criada usando-se a máxima degeneração do códon permitida pelo código genético. Uma indicação de que
25 duas seqüências de ácidos nucléicos são substancialmente idênticas, é quando o polipeptídeo codificado pelo primeiro

ácido nucléico tem reação imunológica cruzada com o polipeptídeo codificado pelo segundo ácido nucléico.

(e) (ii) O termo "identidade substancial" no contexto de
5 um peptídeo indica que um peptídeo compreende uma seqüência
de pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou mais de identidade
de seqüência para uma seqüência referência e sobre uma janela
de comparação especificada. O alinhamento ideal para estes
efeitos pode ser realizado utilizando-se o algoritmo de
10 alinhamento global de Needleman e Wunsch (1970) *supra*. Uma
indicação de que duas seqüências de peptídeos são
substancialmente idênticas é quando um peptídeo é
imunologicamente reativo aos anticorpos gerados contra um
segundo peptídeo. Assim, um peptídeo é substancialmente
15 idêntico a um segundo peptídeo, por exemplo, quando os dois
peptídeos diferem apenas por uma substituição conservada.
Peptídeos que são "substancialmente similares" compartilham
seqüências, como observado acima, exceto pelo fato de que, as
posições de resíduos que não são idênticas podem diferir por
20 mudanças de aminoácidos conservados.

Aqui o uso do termo "construto de nucleotídeo" não se
destina a limitar os melhoramentos para construtos de
nucleotídeos compreendendo DNA. Aqueles com competências
25 normais na arte reconhecerão que construtos de nucleotídeo,
particularmente polinucleotídeos e oligonucleotídeos
compostos por ribonucleotídeos e combinações de

ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos, também podem ser empregados nos métodos aqui divulgados. Os construtos de nucleotídeos, ácidos nucléicos, e as seqüências de nucleotídeos dos melhoramentos abrangem adicionalmente todas as formas complementares de tais construtos, moléculas, e seqüências. Além disso, os construtos de nucleotídeo, moléculas de nucleotídeo e seqüências de nucleotídeos dos melhoramentos abrangem todos os construtos, moléculas, e seqüências de nucleotídeos que podem ser utilizados nos métodos dos melhoramentos para transformar plantas, incluindo, mas não se limitando a, aqueles compostos de desoxirribonucleotídeos, ribonucleotídeos e combinações destes. Tais desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos incluem naturalmente as moléculas e seus análogos sintéticos. Os construtos de nucleotídeos, ácidos nucléicos, e as seqüências de nucleotídeos dos melhoramentos também englobam todas as formas de construções de nucleotídeos, incluindo, mas não se limitando a, formas de fita simples, formas dupla fita, grampos (*hairpins*), estruturas de tronco e laço (*stem-and-loop*), e assim por diante.

Outro melhoramento diz respeito a um organismo transformado, tal qual um organismo selecionado do grupo consistindo de células vegetais e insetos, bactérias, leveduras, baculovírus, protozoários, nematóides, e algas. O organismo transformado compreende: uma molécula de DNA dos melhoramentos, um cassete de expressão compreendendo a dita

molécula de DNA, ou um vetor compreendendo o dito cassete de expressão, que pode ser incorporado de forma estável no genoma do organismo transformado.

5 As seqüências dos melhoramentos são providas em construtos de DNA para a expressão no organismo de interesse. O construto irá incluir seqüências regulatórias a 5' e a 3' operacionalmente ligadas a uma seqüência dos melhoramentos. O termo "operacionalmente ligado", como utilizado aqui se
10 refere a uma articulação funcional entre um promotor e uma segunda seqüência, onde a seqüência promotora inicia e medeia a transcrição da seqüência de DNA correspondente à segunda seqüência. Geralmente, operacionalmente ligado significa que as seqüências de ácidos nucleicos sendo ligadas são contíguas
15 e, se for necessário juntar duas regiões codificantes de proteínas, contínuas e no mesmo quadro de leitura. A construção pode conter ainda, pelo menos, um gene adicional a ser co-transformado no organismo. Alternativamente, o gene (s) adicional pode ser fornecido em várias construções de
20 DNA.

Um destes construtos de DNA é fornecido com uma pluralidade de sítios de restrição para a inserção da seqüência de toxina Cry sob a regulação transcricional das regiões reguladoras. O
25 construto de DNA pode adicionalmente conter genes marcadores selecionáveis.

O construto de DNA vai incluir na direção 5 'para 3' de transcrição: uma região de iniciação de transcrição e tradução (ou seja, um promotor), uma sequência de DNA dos melhoramentos, e uma região de terminação da transcrição e tradução (isto é, região de terminação,) funcional no organismo que serve de hospedeiro. A região de iniciação de transcrição (ou seja, o promotor) pode ser nativo, análogo, estrangeiro ou heterólogo ao organismo hospedeiro e/ou a sequência dos melhoramentos. Além disso, o promotor pode ser uma sequência natural ou, alternativamente, uma sequência sintética. O termo "estrangeiro", conforme usado aqui indica que o promotor não é encontrado no organismo nativo em que o promotor é introduzido. Quando o promotor está "estrangeiro" ou "heterólogo" para a sequência dos melhoramentos, pretende-se que o promotor não é um promotor nativo ou natural para a sequência operacionalmente ligada dos melhoramentos. Conforme utilizado aqui, um gene quimérico compreende uma sequência de codificação operacionalmente ligada a uma região de início de transcrição que é heteróloga para a sequência de codificação. Sempre que o promotor é uma sequência nativa ou natural, a expressão da sequência operacionalmente ligada é alterada a partir da expressão do tipo selvagem, o que resulta em uma alteração no fenótipo.

A região de terminação pode ser nativa com a região de início de transcrição, pode ser nativa com a sequência de DNA operacionalmente ligada de interesse, pode ser nativa com a

planta hospedeira, ou pode ser derivada de outra fonte (ou seja, estrangeira ou heteróloga para o promotor, a sequência de interesse, ou a planta hospedeira, ou qualquer combinação destas).

5

As regiões de terminação convenientes estão disponíveis a partir do plasmídeo Ti de *A. tumefaciens*, como as regiões de terminação de octopina sintase e nopalina sintase. Veja também Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; e Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

15

Se for o caso, um ácido nucléico pode ser otimizado para a expressão aumentada no organismo hospedeiro. Assim, quando o organismo hospedeiro é uma planta, os ácidos nucléicos sintéticos podem ser sintetizados utilizando-se códons preferenciais de plantas para uma expressão melhorada. Veja, por exemplo, Campbell e Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 para uma discussão de utilização de códon preferencial de hospedeiro. Por exemplo, apesar de que as sequências de ácido nucléico dos melhoramentos possam ser expressas tanto em espécies de plantas monocotiledôneas quanto dicotiledôneas, as sequências podem ser modificadas para conter os códons preferências e conteúdo GC preferencial específicos de

25

monocotiledôneas ou dicotiledôneas, uma vez que, têm-se demonstrado que estas preferências diferem (Murray *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498). Assim, o códon preferencial de milho para um determinado aminoácido pode ser

5 derivados de seqüências de genes conhecidas a partir de milho. A utilização de códon do milho de 28 genes de plantas de milho está listada na Tabela 4 de Murray *et al. supra*. Os métodos são disponíveis na arte de síntese de genes preferenciais de plantas. Veja, por exemplo, em U.S. Patent

10 Nos. 5,380,831, e 5,436,391, e Murray *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, aqui incorporadas pela referência.

Seqüências de modificação adicionais são conhecidas por aumentar a expressão do gene em um hospedeiro celular. Estas

15 incluem a eliminação de seqüências codificando sinais de poliadenilação espúrios, sinais de local de emendo (*splicing*) de exon-íntron, repetições tipo transposon, e outras seqüências bem caracterizadas que podem ser prejudiciais à expressão do gene. O conteúdo GC da seqüência pode ser

20 ajustado para níveis médio para um determinado hospedeiro celular, conforme calculado por referência aos genes conhecidos e expressos na célula hospedeira. O termo "célula hospedeira", conforme usado aqui se refere a uma célula que contém um vetor e suporta a replicação e/ou expressão do

25 vetor de expressão destinado. Células do hospedeiro podem ser células procarióticas como *E. coli* ou células eucarióticas como leveduras, insetos, anfíbios, ou células de mamíferos,

ou células de plantas monocotiledôneas ou dicotiledôneas. Um exemplo de uma célula hospedeira de monocotiledôneas é uma célula hospedeira de milho. Quando possível, a sequência é modificada para evitar estrutura secundária prevista de grampo no mRNA.

Os cassetes de expressão podem conter ainda sequências 5' líder. Tais sequências líder podem atuar para melhorar a tradução. Traduções de líderes são conhecidas na arte e incluem: os líderes picornavírus, por exemplo, líder EMCV (região não codificante 5' de Encefalomiocardite) (Elroy-Stein et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6126-6130); líderes potyvirus, por exemplo, líder do TEV (vírus da cauterização do tabaco, *Tobacco Etch Virus*) (Gallie et al. (1995) *Gene* 165(2): 233-238), líder MDMV (vírus-do-mosaico-anão-do-milho, *Maize Dwarf Mosaic Virus*), proteína de ligação da cadeia pesada da imunoglobulina humana (BiP) (Macejak et al. (1991) *Nature* 353: 90-94); líder não traduzido do mRNA da proteína capsidial do vírus do mosaico da alfafa (AMV RNA 4) (Jobling et al. (1987) *Nature* 325: 622-625); líder do vírus do mosaico do tabaco (TMV) (Gallie et al. (1989) in *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, New York), pp. 237-256); e líder do vírus da mancha clorótica de milho (MCMV) (Lommel et al. (1991) *Virology* 81: 382-385). Veja também, Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84: 965-968.

Na construção do cassete de expressão, vários fragmentos de DNA podem ser manipulados de modo a fornecer seqüências de DNA na orientação correta e, quando apropriado, no quadro de leitura adequado. Para este fim, adaptadores ou conectores
5 podem ser empregados para unir os fragmentos de DNA, ou outras manipulações podem estar envolvidas para fornecer sítios de restrição convenientes, remoção de DNA supérfluo, retirada de sítios de restrição, ou similares. Para esse propósito, podem estar envolvidos mutagêneses *in vitro*,
10 reparo por iniciadores, restrição, anelamento e re-substituições, como por exemplo, transições e transversões.

Um número de promotores pode ser utilizado na prática dos melhoramentos. Os promotores podem ser selecionados com
15 base no resultado desejado. Os ácidos nucleicos podem ser combinados com promotores constitutivos, tecido-preferenciais, induzíveis, ou outros de expressão no organismo hospedeiro. Promotores constitutivos adequados para uso em uma célula hospedeira de planta incluem, por exemplo,
20 o promotor central do promotor Rsyn7 e outros promotores constitutivos divulgados no WO 99/43838 e U.S. Patent No. 6,072,050; o promotor CaMV 35S central (Odell et al. (1985) *Nature* 313: 810-812); actina de arroz (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); ubiquitina (Christensen et al. (1989)
25 *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 e Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689); pEMU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588); MAS (Velten et al. (1984)

EMBO J. 3:2723-2730); promotor ALS (E.U. Patent No. 5.659.026), e assim por diante. Outros promotores constitutivos incluem, por exemplo, aqueles discutidos nas patentes U.S. Patent Nos. 5,608,149; 5,608,144; 5,604,121; 5 5,569,597; 5,466,785; 5,399,680; 5,268,463; 5,608,142; e 6,177,611.

Dependendo do resultado desejado, pode ser benéfico se expressar o gene a partir de um promotor induzível. Os
10 promotores induzíveis por ferida são de particular interesse para a regulação da expressão de sequências de nucleotídeos dos melhoramentos em plantas. Esses ferida-induzíveis podem responder a danos causados pela alimentação de inseto, e incluem o gene inibidor de protease de batata (PIN II) (Ryan
15 (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28: 425-449; Duan et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 494-498); *wun1* e *wun2*, US Patent No. 5,428,148; *win1* e *win2* (Stanford et al. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215: 200-208); Sistema Único (McGurl et al. (1992) *Science* 225: 1570-1573); WIP1 (Rohmeier et al. (1993) *Plant*
20 *Mol. Biol.* 22: 783-792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323: 73-76); o gene MPI (Corderok et al. (1994) *Plant J.* 6(2): 141-150); e afins, aqui incorporados pela referência.

Além disso, os promotores induzíveis por patógeno podem
25 ser empregados nos métodos e construtos de nucleotídeos dos melhoramentos. Tais promotores induzíveis por patógeno incluem aqueles provenientes de proteínas relacionadas à

patogênese (PR), que são induzidas após uma infecção por um patógeno, por exemplo, proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanase, quitinase, etc. Veja, por exemplo, Redolfi et al. (1983) *Neth. J. Plant Pathol.* 89: 245-254; Uknes et al. (1992) *Plant Cell* 4: 645-656; e Van Loon (1985) *Plant Mol. Virol.* 4: 111-116. Veja também WO 99/43819, aqui incorporados por referência.

Os promotores de interesse são aqueles que são expressos localmente ou perto do local de infecção do patógeno. Veja, por exemplo, Marineau et al. (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:335-342; Matton et al. (1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-331; Somsisch et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2427-2430; Somsisch et al. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 2:93-98; e Yang (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14972-14977. Veja também, Chen et al. (1996) *Plant J.* 10:955-966; Zhang et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2507-2511; Warner et al. (1993) *Plant J.* 3:191-201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961-968; U.S. Patent No. 5,750,386 (induzível por nematóide) e as referências aí citadas. De particular interesse é o promotor induzível para os genes PRms de milho, cuja expressão é induzida pelo fungo *Fusarium moniliforme* (ver, por exemplo, Cordero et al. (1992) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41:189-200).

25

A regulação química dos promotores pode ser usada para modular a expressão de um gene em uma planta através da

aplicação de um regulador químico exógeno. Dependendo do objetivo, o promotor pode ser um promotor produto químico-induzível, quando a aplicação do produto químico induz a expressão do gene, ou um promotor produto químico-repressível, onde a aplicação do produto químico reprime a expressão do gene. Promotores quimicamente induzíveis são conhecidos na arte e incluem, mas não estão limitados a, promotor In2-2 de milho, que é ativado por fitotoxicidade de herbicidas benzenossulfonamida, o promotor GST de milho, que é ativado por compostos eletrofílicos hidrofóbicos que são usados como herbicidas pré-emergentes, e promotor PR-1a do tabaco, que é ativado pelo ácido salicílico. Outros promotores regulados por produtos químicos de interesse incluem promotores esteróide-responsivos (ver, por exemplo, o promotor induzível por glicocorticóide em Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421-10425 e McNellis et al. (1998) *Plant J.* 14(2):247-257) e induzíveis por tetraciclina e promotores reprimidos por tetraciclina (ver, por exemplo, Gatz et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237, e U.S. Patent Nos. 5,814,618 e 5,789,156), aqui incorporados pela referência.

Promotores tecido-preferenciais podem ser utilizados para direcionar melhor a expressão da proteína pesticida dentro de um tecido vegetal particular. Os promotores tecido-preferenciais incluem aqueles discutidos em Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamata et al. (1997) *Plant*

Cell Physiol. 38(7):792-803; Hansen et al. (1997) *Mol. Gen Genet.* 254(3):337-343; Russell et al. (1997) *Transgenic Res.* 6(2):157-168; Rinehart et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(3):1331-1341; Van Camp et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevascini et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:181-196; Orozco et al. (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6):1129-1138; Matsuoka et al. (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590; e Guevara-Garcia et al. (1993) *Plant J.* 4(3):495-505.

Tais promotores podem ser modificados, se necessário, para expressão fraca.

Promotores preferenciais para folha são conhecidos na arte. Veja, por exemplo, Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12 (2) :255-265; Kwon et al. (1994) *Plant Physiol.* 105:357-67; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35 (5):773-778; Gotor et al. (1993) *Plant J.* 3:509-18; Orozco et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 23 (6):1129-1138; e Matsuoka et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 90 (20):9586-9590.

Promotores preferenciais para raiz ou específicos para raiz são conhecidos e podem ser selecionados entre os muitos disponíveis na literatura ou isolados de novo a partir de várias espécies compatíveis. Veja, por exemplo, Hire et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 20(2):207-218 (gene glutamina sintetase de raiz de soja específico); Keller e Baumgartner

(1991) *Plant Cell* 3(10):1051-1061 (elemento de controle raiz específico no gene GRP1.8 de feijão francês); Sanger et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 14(3):433-443 (promotor raiz-específico de genes da manopina sintase (MAS) de *Agrobacterium tumefaciens*); e Miao et al. (1991) *Plant Cell* 3(1):11-22 (clone de cDNA de tamanho integral codificando glutamina sintetase citosólica, que se expressa nas raízes e nódulos de raiz de soja). Veja também Bogusz et al. (1990) *Plant Cell* 2(7):633-641, onde são descritos dois promotores específicos de raiz isolados de genes da hemoglobina a partir da *Parasponia andersonii* não leguminosa e fixadora de nitrogênio e de *Trema tomentosa* não-fixadoras de nitrogênio e não leguminosas relacionada. Os promotores destes genes foram ligados a um gene β -glucuronidase repórter e introduzidos tanto a *Nicotiana tabacum* não leguminosa quanto em *Lotus corniculatus* leguminosa e, e em ambos os casos, a atividade do promotor raiz-específico foi preservada. Leach e Aoyagi (1991) descrevem a análise dos promotores dos genes raiz-induzíveis altamente expressos *rolC* e *rolD* de *Agrobacterium rhizogenes* (ver *Plant Science* (Limerick) 79(1):69-76). Eles concluíram que determinantes de DNA potenciadores e tecido-preferenciais são dissociados nos promotores. Teeri et al. (1989) utilizaram fusão gênica ao *lacZ* para mostrar que o gene que codifica a enzima octopina de T-DNA de *Agrobacterium* é especialmente ativo na epiderme da ponta da raiz e que o gene TR2 é raiz-específico na planta intacta e estimulado por ferimento em tecido foliar , uma combinação especial de

características desejáveis para uso com um gene inseticida ou larvicida (ver *EMBO J.* 8(2):343-350). O gene TR1' fundido a *nptII* (neomicina fosfotransferase II) apresentaram características semelhantes. Promotores preferenciais de raiz
 5 adicionais incluem o promotor do gene VfENOD-GRP3 (Kuster et al. (1995) *Plant Mol. Biol.* 29 (4) :759-772); e o promotor rolB (Capana et al. (1994) *Plant Mol. Biol.* 25 (4) :681-691. Veja também as patentes U.S. Patent Nos. 5,837,876; 5,750,386; 5,633,363; 5,459,252; 5,401,836; 5,110,732; e
 10 5,023,179.

Promotores "raiz-preferenciais" incluem tanto as promotores "específicos" de sementes (os promotores ativos durante o desenvolvimento da semente, tais como promotores de
 15 proteínas de armazenamento de sementes), bem como promotores "de germinação de semente" (os promotores ativos durante a germinação das sementes). Veja Thompson et al. (1989) *BioEssays* 10:108, aqui incorporados por referência. Tais promotores preferenciais de sementes incluem, mas não estão
 20 limitados a, Cim1 (mensagem citocinina-induzida); cZ19B1 (milho 19 kDa Zein) e milps (mio-inositol-1-fosfato sintase) (ver U.S. Patent No. 6,225,529, aqui incorporadas pela referência). Gama-Zein e Glob-1 são promotores específicos de endosperma. Para dicotiledôneas, promotores específicos de
 25 sementes incluem, mas não estão limitados a, β -faseolina de feijão, napin, β -conglucina, lecitina de soja, cruciferina, e similares. Para monocotiledôneas, os promotores específicos

de sementes incluem, mas não estão limitados a, milho 15 kDa zein, 22 kDa zein, 27 kDa zein, g-Zein, cerosa, encolhido 1, encolhido 2, globulina 1, etc. Veja também WO 00/12733, em que os promotores preferenciais de sementes dos genes *end1* e *end2* são divulgados; aqui incorporados por referência. O promotor que tem expressão "preferencial" em um determinado tecido é expresso neste tecido em um grau maior do que, pelo menos, em um outro tecido da planta. Alguns promotores tecido-preferenciais mostram expressão quase exclusiva no tecido específico.

Onde deseja-se uma expressão de baixo nível, serão utilizados promotores fracos. Geralmente, o termo "promotor fraco" utilizado aqui se refere a um promotor que conduz a expressão de uma sequência de codificação em um nível baixo. Para expressão de nível baixo entende-se níveis de cerca de 1/1000 transcritos para cerca de 1/100, 000 transcritos, para cerca de 1/500, 000 transcritos. Como alternativa, é reconhecido que o termo "promotores fracos" abrange também os promotores que dirigem a expressão a apenas algumas células e não a outras, de forma a gerar um baixo nível total de expressão. Sempre que um promotor dirige a expressão em níveis inaceitavelmente altos, porções da sequência do promotor podem ser excluídas ou modificadas para diminuir os níveis de expressão.

Esses promotores constitutivos fracos incluem, por exemplo, o promotor central do promotor Rsyn7 (WO 99/43838 e U.S. Patent No. 6,072,050), o promotor 35S CaMV central, e similares. Outros promotores constitutivos incluem, por exemplo, aqueles divulgados nas patentes U.S. Patent Nos. 5,608,149; 5,608,144; 5,604,121; 5,569,597; 5,466,785; 5,399,680; 5,268,463; 5,608,142; e 6,177,611; aqui incorporadas por referência.

10 Geralmente, o cassete de expressão compreende um gene marcador de seleção para a seleção de células transformadas. Genes marcadores de seleção são utilizados para a seleção de células ou tecidos transformados. Os genes marcadores incluem genes que codificam a resistência a antibióticos, como
15 aqueles que codificam neomicina fosfotransferase II (NEO) e higromicina fosfotransferase (HPT), bem como os genes que conferem resistência aos compostos herbicidas, como o glufosinato de amônio, bromoxinil, imidazolinonas, e 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D). Outros exemplos de genes
20 marcadores de seleção adequados incluem, mas não estão limitados a, genes que codificam a resistência ao cloranfenicol (Herrera Estrella et al. (1983) *EMBO J.* 2:987-992), metotrexato (Herrera Estrella et al. (1983) *Nature* 303:209-213; e Meijer et al. (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:807-
25 820), estreptomicina (Jones et al. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210:86-91); espectinomicina (Bretagne-Sagnard et al. (1996) *Transgenic Res.* 5:131-137); bleomicina (Hille et al. (1990)

Plant Mol. Biol. 7:171-176); sulfonamida (Guerineau et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:127-136); bromoxinil (Stalker et al. (1988) *Science* 242:419-423), glifosato (Shaw et al. (1986) *Science* 233:478-481; e U.S. Application Serial Nos. 10/004,357, e 10/427,692); fosfinotricina (DeBlock et al. (1987) *EMBO J.* 6:2513-2518). Ver em geral, Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3: 506-511; Christopherson et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6314-6318; Yao et al. (1992) *Cell* 71: 63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6: 2419-2422; Barkley et al. (1980) em *The Operon*, pp. 177-220; Hu et al. (1987) *Cell* 48: 555-566; Brown et al. (1987) *Cell* 49: 603-612; Figge et al. (1988) *Cell* 52: 713-722; Deuschle et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5400-5404; Fuerst et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2549-2553; Deuschle et al. (1990) *Science* 248: 480-483; Gossen (1993) tese de doutorado, *University of Heidelberg*; Reines et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1917-1921; Labow et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 3343-3356; Zambretti et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3952-3956; Baim et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5072-5076; Wyborski et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* 10: 143-162; Degenkolb et al. (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1591-1595; Kleinschmidt et al. (1988) *Biochemistry* 27: 1094-1104; Bonin (1993) tese de doutorado, *University of Heidelberg*; Gossen et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551; Oliva et al. (1992) *Antimicrob. Agents*

Chemother. 36: 913-919; Hlavka et al. (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); e Gill et al. (1988) *Nature* 334: 721-724. Tais divulgações são aqui incorporadas por referência.

5

A lista acima de genes marcadores de seleção não pretende ser uma limitação. Qualquer gene marcador de seleção pode ser usado nos melhoramentos.

10

Os métodos dos melhoramentos implicam a introdução de um polipeptídeo ou polinucleotídeo em uma planta. "Introdução" significa apresentar o polinucleotídeo ou polipeptídeo para a planta de tal forma que a seqüência ganhe acesso ao interior de uma célula da planta. Os métodos dos melhoramentos não dependem de um método específico para a introdução de um polinucleotídeo ou polipeptídeo em uma planta, apenas que os polinucleotídeos ou polipeptídeos ganhem acesso ao interior, de pelo menos, uma célula da planta. Métodos de introdução de nucleotídeos ou polipeptídeos em plantas são conhecidos na arte, incluindo, mas não se limitando a, os métodos de transformação estável, métodos de transformação transitória e métodos mediados por vírus.

20

"Transformação estável" deve significar que o construto de nucleotídeo introduzido em uma planta se integra no genoma da planta e é capaz de ser herdado pelos descendentes da mesma. Por "transformação transitória" entende-se que um

25

polinucleotídeo é introduzido na planta e não se integra no genoma desta planta, ou um polipeptídeo é introduzido em uma planta.

- 5 Protocolos de transformação, bem como os protocolos para a introdução de sequências de nucleotídeos em plantas podem variar dependendo do tipo de planta ou célula de planta, ou seja, monocotiledônea ou dicotiledônea, alvejada para a transformação. Métodos adequados de introdução de sequências
- 10 de nucleotídeos em células vegetais e posterior inserção no genoma da planta incluem microinjeção (Crossway *et al.* (1986) *Biotechniques* 4: 320-334), eletroporação (Riggs *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5602-5606), transformação mediada por *Agrobacterium* ((U.S. Patent Nos. 5,563,055 e
- 15 5,981,840), a transferência direta de genes (Paszkowski *et al.* (1984) *EMBO J.* 3: 2717-2722), e aceleração, ou bombardeamento de partículas balísticas (ver , por exemplo, , U.S. Patent Nos. 4,945,050; 5,879,918; 5,886,244; e 5,932,782; Tomes *et al.* (1995) em *Plant Cell, Tissue, e Organ*
- 20 *Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg e Phillips (Springer-Verlag, Berlin); e McCabe *et al.* (1988) *Biotechnology* 6: 923-926); e transformação de Lecl (WO 00/28058). Para transformação de batata ver Tu *et al.* (1998) *Plant Molecular Biology* 37: 829-838 e Chong *et al.* (2000)
- 25 *Transgenic Research* 9: 71-78. Processos de transformação adicionais podem ser encontrados em Weissinger *et al.* (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477; Sanford *et al.* (1987)

Particulate Science and Technology 5: 27-37 (cebola);
 Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87: 671-674 (soja);
 McCabe et al. (1988) *Bio/Technology* 6: 923-926 (soja); Finer
 e McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P: 175-182
 5 (soja); Singh et al. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 319-324
 (soja); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8: 736-740 (arroz);
 Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4305-4309
 (milho); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6: 559-563 (milho);
 U.S. Patent Nos. 5,240,855; 5,322,783 e 5,324,646; Klein et
 10 al. (1988) *Plant Physiol.* 91: 440-444 (milho); Fromm et al.
 (1990) *Biotechnology* 8: 833-839 (milho); Hooykaas-Van
 Slogteren et al. (1984) *Nature (London)* 311: 763-764; U.S.
 Patent No. 5,736,369 (cereais); Bytebier et al. (1987) *Proc.*
Natl. Acad. Sci. USA 84: 5345-5349 (Liliaceae); De Wet et al.
 15 (1985) em *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed.
 Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209 (pólen);
 Kaeppler et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9: 415-418 e
 Kaeppler et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84: 560-566
 (transformação mediada por *whisker*); D'Halluin et al. (1992)
 20 *Plant Cell* 4: 1495-1505 (eletroporação); Li et al. (1993)
Plant Cell Reports 12: 250-255 e Christou e Ford (1995)
Annals of Botany 75: 407-413 (arroz); Osjoda et al. (1996)
Nature Biotechnology 14: 745-750 (milho via *Agrobacterium*
tumefaciens); os quais são aqui incorporados por referência.

25

Em melhoramentos específicos, as seqüências dos
 melhoramentos podem ser fornecidas a uma instalação usando-se

uma variedade de métodos de transformação transitória. Tais métodos de transformação transitória incluem, mas não estão limitados a, a introdução da proteína da toxina Cry ou variantes e fragmentos destas diretamente na planta, ou a
5 introdução do transcrito da toxina Cry na planta. Tais métodos incluem, por exemplo, a microinjeção ou bombardeamento de partículas. Veja, por exemplo, Crossway et al. (1986) *Mol Gen. Genet.* 202: 179-185; Nomura et al. (1986) *Plant Sci.* 44: 53-58; Hepler et al. (1994) *Proc. Natl. Acad.*
10 *Sci.* 91: 2176-2180 e Hush et al. (1994) *The Journal of Cell Science* 107: 775-784, os quais são aqui incorporados por referência. Alternativamente, o polinucleotídeo da toxina Cry pode ser transformado transitoriamente em planta utilizando-se técnicas conhecidas na arte. Essas técnicas incluem
15 sistemas de vetores virais e a precipitação dos polinucleótidos de um modo que impede a posterior liberação do DNA. Assim, a transcrição do DNA ligado a partícula pode ocorrer, mas a frequência com a qual ele é liberado para integrar-se no genoma é extremamente reduzida. Tais métodos
20 incluem o uso de partículas revestidas com polietilenoimina (PEI; Sigma # P3143).

Os métodos são conhecidos na arte para a inserção de um polinucleotídeo alvejado em um local específico do genoma da
25 planta. Em um melhoramento, a inserção do polinucleotídeo em um local desejado do genômica é conseguida usando-se um sistema de recombinação sítio-específica. Veja, por exemplo,

WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855, e WO99/25853, todos os quais são aqui incorporados por referência. Resumidamente, o polinucleotídeo dos melhoramentos pode ser colocado em um cassete de transferência ladeado por dois
5 sítios de recombinação não-idênticos. O cassete de transferência é introduzido em uma planta que tenha estavelmente incorporado em seu genoma um sítio alvo circundado que é ladeado por dois sítios de recombinação não-idênticos que correspondem aos sítios do cassete de
10 transferência. Uma recombinase adequada é fornecida e o cassete de transferência é integrado no sítio alvo. O polinucleotídeo de interesse é, assim, integrado em uma posição cromossômica específica no genoma da planta.

15 As células que foram transformadas podem ser crescidas em plantas de acordo com as formas convencionais. Veja, por exemplo, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5: 81-84. Estas plantas podem então ser crescidas, e até polinizadas com a mesma linhagem ou com diferentes linhagens
20 transformadas, e o híbrido resultante, tendo a expressão constitutiva ou induzida da característica fenotípica desejada, identificado. Duas ou mais gerações podem ser crescidas para se garantir que a expressão da característica fenotípica desejada é mantida de forma estável e herdada e,
25 em seguida, as sementes podem ser colhidas para garantir que a expressão da característica fenotípica desejada foi alcançada.

As seqüências de nucleotídeos dos melhoramentos podem ser fornecidas para a planta através da colocação da planta em contato com um vírus ou com os ácidos nucléicos virais.

5 Geralmente, esses métodos envolvem a incorporação de nucleotídeos de interesse na construção de um DNA viral ou molécula de RNA. É reconhecido que as proteínas recombinantes dos melhoramentos podem inicialmente ser sintetizadas como parte de uma poliproteína viral, que posteriormente pode ser
10 processada por proteólise *in vivo* ou *in vitro* para produzir a proteína pesticida desejada. Também é reconhecido que tal poliproteína viral, incluindo pelo menos uma parte da seqüência de aminoácidos de uma proteína pesticida dos melhoramentos, pode ter a atividade pesticida desejada. Tais
15 poliproteínas virais e as seqüências de nucleotídeos que codificam para estas não são abrangidas pelos melhoramentos. Métodos de fornecimento de plantas com construtos de nucleotídeos e produzindo as proteínas codificadas nas plantas, que envolvem o DNA viral ou de moléculas de RNA são
20 conhecidas na arte. Veja, por exemplo, U.S. Patent Nos. 5,889,191; 5,889,190; 5,866,785; 5,589,367; e 5,316,931; aqui incorporados por referência.

Os melhoramentos posteriormente relacionados com os
25 materiais de propagação de plantas de uma planta transformada dos melhoramentos incluem, mas não estão limitados a,

sementes, tubérculos, rizomas, bulbos, folhas e cortes de raízes e brotos.

Os melhoramentos podem ser utilizados para a
5 transformação de qualquer espécie vegetal, incluindo, mas não se limitando a, monocotiledôneas e dicotiledôneas. Exemplos de plantas de interesse incluem, mas não estão limitados a, milho (*Zea mays*), *Brassica* sp. (por exemplo, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), particularmente aquelas espécies de
10 *Brassica* úteis como fontes de óleo de semente, alfafa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeio (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), milho (por exemplo, milheto (*Pennisetum glaucum*), painço (*Panicum miliaceum*), painço-da-Itália (*Setaria italica*), *Panicum-de-*
15 *dedo* ou capim-pé-de-galinha (*Eleusine coracana*), girassol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata (*Solanum tuberosum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), algodão (*Gossypium barbadense*, *Gossypium*
20 *hirsutum*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), abacaxi (*Ananas comosus*), citros (*Citrus* spp.), cacau (*Theobroma cacao*), chá (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), abacate (*Persea americana*), figueira (*Ficus casica*),
25 goiaba (*Psidium guajava*), manga (*Mangifera indica*), oliveira (*Olea europaea*), mamão (*Carica papaya*), caju (*Anacardium occidentale*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), amêndoa

(*Prunus amygdalus*) , beterraba (*Beta vulgaris*), cana de açúcar (*Saccharum* spp.), aveia, cevada, legumes, plantas ornamentais, e coníferas.

- 5 Legumes incluem tomate (*Lycopersicon esculentum*), alface (por exemplo, *Lactuca sativa*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), feijão-de-lima (*Phaseolus limensis*), ervilha (*Lathyrus* spp.), E os membros do gênero *Cucumis*, tais como pepino (*C. sativus*), melão (*C. cantalupensis*), almíscar-melão (*C. melo*).
- 10 Plantas ornamentais incluem Azaléia (*Rhododendron* spp.), Hortênsia (*Macrophylla hydrangea*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), Tulips (*Tulipa* spp.), Narcisos (*Narciso* spp.), Petúncias (*Petunia hybrida*), cravo (*Dianthus caryophyllus*), poinsetia (*Euphorbia pulcherrima*), e
- 15 crisântemo. Coníferas que podem ser empregadas na prática dos melhoramentos incluem, por exemplo, pinheiros, como pinheiro-amarelo (*Pinus taeda*), pinheiro-americano (*Pinus elliotti*), pinheiro-ponderosa (*Pinus ponderosa*), pinheiro de Lodgepole (*Pinus contorta*), pinheiro-de-Monterey (*Pinus radiata*);
- 20 pinheiro Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*); cicuta-ocidental (*Tsuga canadensis*); cedro Sitka (*Picea glauca*); sequóia (*Sequoia sempervirens*); pinheiros verdadeiros, como o Abeto-prateado (*Abies amabilis*) e abeto-balsâmico (*Abies balsamea*); e cedros como o cedro-vermelho-ocidental (*Thuja*
- 25 *plicata*) e cedro-amarelo-do-Alasca (*Chamaecyparis nootkatensis*). As plantas dos melhoramentos incluem plantas de cultivo (por exemplo, milho, alfafa, girassol, Brassica,

soja, algodão, cártamo, amendoim, sorgo, trigo, milho, tabaco, etc), tais como plantas de milho e soja.

Gramíneas incluem, mas não estão limitados a: capim-do-
 5 campo-anual (*Poa annua*); azevém (*Lolium multiflorum*); capim-
 do-campo-do-Canadá (*Poa compressa*); festuca-vermelha (*Festuca*
rubra); agrostis (*Agrostis tenuis*); grama-rasteira (*Agrostis*
palustris); grama-de-trigo-cristada (*Agropyron desertorum*);
 grama-de-trigo fairway (*Agropyron cristatum*); festuca-dura
 10 (*Festuca longifolia*); agrostis-de-Kentucky (*Poa pratensis*);
 dátilo-dos-pomares (*Dactylis glomerata*); azevém-perene
 (*Lolium perenne*), Festuca (*Festuca rubra*); gramado-vermelho
 (*Agrostis alba*); agrostis-bruto (*Poa trivialis*); festuca-de-
 ovelha (*Festuca ovina*); agrostis-liso (*Bromus inermis*);
 15 sargasso-bravo (*Festuca arundinacea*), erva-dos-prados (*Phleum*
pratense); agrostis-veludo (*Agrostis canina*); alkaligrass
 chorando (*Puccinellia distans*); grama-de-trigo-ocidental
 (*Agropyron smithii*); grama-Bermuda (*Cynodon* spp.); grama-St.
 Augustine (*Stenotaphrum secundatum*); grama-esmeralda (*Zoysia*
 20 spp.); capim-Bahia (*Paspalum notatum*), grama-tapete (*Axonopus*
affinis); grama-centopéia (*Eremochloa ophiuroides*); capim-
 quicuí (*Pennisetum clandestinum*); paspalum-de-praia (*Paspalum*
vaginatum); grama-azul (*Bouteloua gracilis*); capim-búfalo
 (*Buchloe dactyloids*); grama sideoats (*Bouteloua*
 25 *curtipendula*).

Plantas de interesse incluem plantas que fornecem as sementes de grãos de interesse, oleaginosas e leguminosas. Sementes de interesse incluem sementes de grãos, como milho, trigo, cevada, arroz, sorgo, centeio, milho, etc. Oleaginosas
5 incluem algodão, soja, cártamo, girassol, *Brassica*, milho, alfafa, palma, coco, linho, mamona, plantas de oliva etc. Vagem incluem feijões e ervilhas. Feijão inclui feijão, alfarroba guar, feno, soja, feijão jardim, caupi, feijão *mungbean*, fava, feijão fava, lentilha, grão de bico, etc.

10

Em determinados melhoramentos as seqüências de ácido nucléico dos melhoramentos podem ser empilhadas com qualquer combinação de seqüências de polinucleótidos de interesse, a fim de se criar plantas com um fenótipo desejado. Por
15 exemplo, os polinucleotídeos dos melhoramentos podem ser empilhados com quaisquer outros polinucleotídeos codificando polipeptídeos com atividade pesticidas e/ou inseticida, tais como outras proteínas *Bt* tóxicas (descritas nas patentes U.S. Patent Nos. 5,366,892; 5,747,450; 5,736,514; 5,723,756;
20 5,593,881; e em Geiser *et al.* (1986) *Gene* 48:109), Pentin (descrito no U.S. Patent No. 5,981,722) e similares. As combinações geradas também podem incluir várias cópias de qualquer um dos polinucleotídeos de interesse. Os polinucleotídeos dos melhoramentos também podem ser
25 empilhados com qualquer outro gene ou uma combinação de genes para produzir plantas com uma variedade de combinações de características desejadas, incluindo, mas não se limitando a

características desejáveis para a alimentação animal, tais como genes de oleosidade elevadas (por exemplo, U.S. Patent No. 6,232,529); aminoácidos equilibrados (por exemplo, hordotioninas (U.S. Patent Nos. 5,990,389; 5,885,801; 5,885,802; e 5,703,049); cevada com lisina alta (Williamson et al. (1987) *Eur. J. Biochem.* 165: 99-106; e WO 98/20122) e proteínas com metionina elevada (Pedersen et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 6279; Kirihara et al. (1988) *Gene* 71: 359; e Musumura et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 123));

10 digestibilidade aumentada (por exemplo, as proteínas de armazenamento modificadas (U.S. Application Serial No. 10/053,410, preenchida em 7 de Novembro, 2001) e tiorredoxinas (U.S. Application Serial No. 10/005,429, preenchida em 3 de dezembro, 2001)), as divulgações dos quais

15 são aqui incorporadas pela referência.

Os polinucleotídeos dos melhoramentos também podem ser empilhados com características desejáveis para a doença ou resistência a herbicidas (por exemplo, os genes de

20 destoxificação de fumonisinas (U.S. Patent No. 5,792,931); genes de avirulência e de resistência à doença (Jones et al. (1994) *Science* 266:789; Martin et al. (1993) *Science* 262: 1432; e Mindrinos et al. (1994) *Cell* 78:1089); acetolactato sintase (ALS) mutantes que levam à resistência a herbicidas,

25 como o S4 e/ou mutações HRA; inibidores de glutamina sintetase como fosfinotricina ou basta (por exemplo, genes *bar*) e resistência ao glifosato (gene EPSPS e gene GAT

conforme divulgado em U.S. Application Serial Nos. 10/004,357; e 10/427,692); e características desejáveis para processamento e transformação de produtos, tais como óleo elevado, (por exemplo, U.S. Patent No. 6,232,529), óleos modificados (por exemplo, genes de ácidos graxos desaturase (U.S. Patent No. 5,952,544; WO 94/11516); amidos modificados (por exemplo, pirofosforilases ADPG (AGPase), amido sintases (SS) , enzimas de ramificação do amido (SBE) e enzimas amido desramificadoras (SDBE)); e polímeros ou bioplásticos (por exemplo, U.S. patent No. 5.602,321; beta-sintase, cetotiolase polihidroxibutirato e acetoacetil-CoA redutase (Schubert et al. (1988) *J. Bacteriol.* 170: 5837-5847) facilitação da expressão de polihidroxialcanoatos (PHAs)), as divulgações dos quais são aqui incorporadas por referência. Pode-se também combinar os polinucleotídeos dos melhoramentos com polinucleotídeos que fornecem características agronômicas, tais como a esterilidade masculina (por exemplo, ver U.S. Patent No. 5.583,210), força de talo, tempo de floração, ou características da tecnologia de transformação, como a regulação do ciclo celular ou alvejamento de gene (por exemplo, WO 99/61619; WO 00/17364; WO 99/25821), as divulgações de que são aqui incorporadas por referência.

Estas combinações empilhadas podem ser criadas por qualquer método, incluindo, mas não se limitando a cruzar plantas reprodutoras por qualquer metodologia convencional ou Top Cross®, ou por transformação genética. Se as

características são empilhadas através de transformação genética das plantas, as sequências de nucleotídeos de interesse podem ser combinadas a qualquer momento e em qualquer ordem. Por exemplo, uma planta transgênica que

5 compreende uma ou mais características desejadas pode ser usada como o destino para introdução de novas características através de posterior transformação. As características podem ser introduzidas simultaneamente em um protocolo de co-

10 transformação com os polinucleotídeos de interesse fornecidos por qualquer combinação dos cassetes de transformação. Por exemplo, se duas sequências serão introduzidas, as duas sequências podem estar contidas em cassetes de transformação separados (*trans*) ou contidos no mesmo cassete de transformação (*cis*). A expressão das sequências pode ser

15 conduzida pelo promotor ou mesmo por promotores diferentes. Em certos casos, pode ser desejável se introduzir um cassete de transformação que irá suprimir a expressão da polinucleotídeo de interesse. Isso pode ser combinado com qualquer combinação de outros cassetes ou supressão ou

20 cassetes de super-expressão para gerar a combinação desejada de características na planta. Reconhece-se também que as sequências de polinucleotídeos podem ser empilhadas em um sítio genômico desejado utilizando-se um sistema de recombinação sítio-específica. Veja, por exemplo, WO99/25821,

25 WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855, e WO99/25853, todos os que estão aqui incorporados por referência.

As composições dos melhoramentos encontram uso na proteção de plantas, sementes e produtos vegetais em uma variedade de maneiras. Por exemplo, as composições podem ser usadas em um método que envolve a colocação de uma quantidade
5 eficaz da composição pesticida no ambiente da praga através de um procedimento selecionado do grupo consistindo de pulverização, varredura, radiodifusão, ou revestimento de sementes.

10 Antes do material de propagação vegetal (frutas, tubérculos, bulbos, rizomas, grãos, sementes), mas, sobretudo sementes, ser vendido como um produto comercial, este é habitualmente tratado com um revestimento protetor incluindo herbicidas, inseticidas, fungicidas, bactericidas,
15 nematocidas, moluscicidas, ou misturas de várias dessas preparações, se desejado, juntamente com outros carreadores, surfactantes, ou adjuvantes promotores de aplicação, habitualmente utilizados na arte da composição para proporcionar proteção contra danos causados por bactérias,
20 fungos ou pestes de animais. A fim de se tratar as sementes, o revestimento protetor pode ser aplicado às sementes seja por impregnação dos tubérculos ou grãos com uma formulação líquida ou revestindo-os com uma formulação combinada molhada ou seca. Além disso, em casos especiais, outros métodos de
25 aplicação para as plantas são possíveis, por exemplo, tratamento dirigido a botões ou aos frutos.

As sementes de plantas dos melhoramentos compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína pesticida dos melhoramentos podem ser tratadas com um revestimento protetor de semente compreendendo um composto de
5 tratamento de sementes, como, por exemplo, captan, carboxina, Tiram, metalaxil, pirimifós-metílico, e outros que são comumente usados no tratamento de sementes. Em um melhoramento, um revestimento protetor de sementes compreendendo uma composição pesticida dos melhoramentos é
10 usado sozinho ou em combinação com um dos revestimentos protetores de semente habitualmente utilizados no tratamento de sementes.

É reconhecido que os genes que codificam proteínas
15 pesticidas podem ser usados para transformar os organismos de inseto patogênicos. Tais organismos incluem baculoviroses, fungos, protozoários, bactérias e nematóides.

Um gene que codifica uma proteína pesticida dos
20 melhoramentos pode ser introduzido através de um vetor adequado em um hospedeiro microbiano, e o dito hospedeiro aplicado ao meio ambiente, ou a plantas ou animais. O termo "introduzido" no contexto de inserção de um ácido nucléico em uma célula significa "transfecção" ou "transformação" ou
25 "transdução" e inclui referência à incorporação de um ácido nucléico em uma célula eucariótica ou procariótica, onde o ácido nucléico pode ser incorporado no genoma da célula (por

exemplo, cromossomos, plasmídeos, plastídeo, ou DNA mitocondrial), convertido em um replicon autónomo ou expressa transitoriamente (por exemplo, mRNA transfectado).

5 Hospedeiros microorganismos que são conhecidos para ocupação da "fitosfera" (filoplano, filosfera, rizosfera, e/ou rizoplano) de uma ou mais culturas de interesse podem ser selecionados. Esses microorganismos são escolhidos de forma que sejam capazes de competir com sucesso com os

10 microorganismos tipo-selvagem no ambiente específico, fornecendo a manutenção estável e a expressão do gene expressando a proteína pesticida e, desejavelmente, fornecendo uma proteção melhorada deste pesticida a partir da degradação e inativação ambiental.

15

Tais microorganismos incluem bactérias, algas e fungos. De particular interesse são os microorganismos como bactérias, por exemplo, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*,

20 *Rhodopseudomonas*, *Methylius*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc*, e *Alcaligenes*, fungos, especialmente leveduras, por exemplo, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* e *Aureobasidium*. De particular interesse são as

25 espécies de bactérias da fitosfera, tais como a *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium*, *Rhodopseudomonas*

spheroides, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*,
Alcaligenes entrophus, *Clavibacter xyli* e *Azotobacter*
vinlandii e espécies de leveduras da fitosfera como
Rhodotorula rubra, *R. glutinis*, *R. Marina*, *R. aurantiaca*,
5 *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*,
Saccharomyces rosei, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*,
Sporobolomyces roseus, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae* e
Aureobasidium pollulans. De particular interesse são os
microorganismos pigmentados.

10

Várias formas para se introduzir um gene que expressa
uma proteína pesticida nos microorganismos hospedeiros em
condições que permitam a manutenção estável e expressão do
gene estão disponíveis. Por exemplo, cassetes de expressão
15 podem ser construídos, de forma que incluam os construtos de
nucleotídeo de interesse operacionalmente ligados com os
sinais de regulação de transcrição e tradução para a
expressão dos construtos de nucleotídeo, e uma sequência de
nucleotídeos homóloga a uma sequência no organismo
20 hospedeiro, aonde a integração irá ocorrer, e/ou um sistema
de replicação que é funcional no hospedeiro onde a integração
ou de manutenção estável irá ocorrer.

Sinais de regulação transcricional e traducional
25 incluem, mas não estão limitados a, promotores, sítio inicial
de iniciação de transcrição, operadores, ativadores,
potencializadores, outros elementos de reguladores, sítios de

ligação ribossomal, um códon de iniciação, sinais de terminação, e assim por diante. Veja, por exemplo, U.S. Patent Nos. 5,039,523 e 4,853,331; EPO 0480762A2; Sambrook et al. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed. Maniatis et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York), daqui em diante como "Sambrook II"; Davis et al., eds. (1980) *Advanced Bacterial Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press), Cold Spring Harbor, New York; e as referências aí citadas.

10

Células hospedeiras adequadas, onde as células contendo proteína pesticida serão tratadas para prolongar a atividade das proteínas pesticidas na célula quando a célula tratada é aplicada ao ambiente da praga alvo (s), podem incluir tanto procariontes quanto eucariontes, normalmente sendo limitado às células que não produzem substâncias tóxicas para os organismos superiores, como os mamíferos. No entanto, os organismos que produzem substâncias tóxicas para os organismos superiores poderiam ser usados, quando a toxina é instável ou o nível de aplicação é suficientemente baixo para evitar qualquer possibilidade de uma toxicidade para mamíferos. Procariotos e eucariotos inferiores, como os fungos são hospedeiros de particular interesse. Procariontes ilustrativos, tanto Gram-negativos quanto gram-positivos, incluem *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus* e; *Bacillaceae*; *Rhizobiaceae*, como *Rhizobium*; *Spirillaceae*, como *Photobacterium*, *Zymomonas*,

15

20

25

Serratia, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; *Lactobacillaceae*; *Pseudomonadaceae*, tais como *Pseudomonas* e *Acetobacter*; *Azotobacteraceae* e *Nitrobacteraceae*. Entre os eucariontes estão os fungos, como *Phycomycetes* e *Ascomycetes*,
5 que incluem leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces* e levedura *Basidiomycetes* como *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, e similares.

As características de interesse em especial na seleção de
10 uma célula hospedeira para fins de produção de proteína
pesticida incluem a facilidade de introdução do gene da
proteína pesticida dentro do hospedeiro, a disponibilidade de
sistemas de expressão, a eficiência de expressão, a
estabilidade das proteínas no hospedeiro, e a presença de
15 capacidades genéticas auxiliares. As características de
interesse para uso como uma micro-cápsula pesticida incluem
qualidades protetoras para o pesticida, tais como paredes
celulares espessas, pigmentação e embalagem intracelular ou
formação de corpos de inclusão, afinidade em folha, ausência
20 de toxicidade em mamíferos; atratividade para ingestão por
parte das pragas; facilidade de matar e fixar sem danos à
toxina, e similares. Outras considerações incluem facilidade
de formulação e gestão, economia, estabilidade no
armazenamento, e similares.

25

Organismos hospedeiros de particular interesse incluem
leveduras, como *Rhodotorula* spp., *Aureobasidium* spp.

Saccharomyces spp. (tal como *S. cerevisiae*), *Sporobolomyces* spp., organismos filoplanos como *Pseudomonas* spp. (tais como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*), *Erwinia* spp. e *Flavobacterium* spp., e outros organismos, incluindo *BT*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, e similares.

Genes que codificam as proteínas pesticidas dos melhoramentos podem ser introduzidos em microorganismos que se multiplicam em plantas (epífitas) para entrega das proteínas pesticidas às potenciais pragas alvo. Em epífitas, por exemplo, podem ser bactérias gram-positivas ou gram-negativas.

As bactérias colonizadoras de raiz, por exemplo, podem ser isolada a partir da planta de interesse por métodos conhecidos na arte. Especificamente, uma linhagem de *Bacillus cereus* que coloniza raízes pode ser isolada de raízes de uma planta (ver, por exemplo, Handelsman et al. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* 56:713-718). Os genes que codificam as proteínas pesticidas dos melhoramentos podem ser introduzidos em um *Bacillus cereus* colonizador de raiz por métodos padronizados e conhecidos na arte.

Os genes que codificam proteínas pesticidas podem ser introduzidos, por exemplo, dentro do *Bacillus* colonizador de raiz por meio de eletrotransformação. Especificamente, os genes que codificam as proteínas pesticidas podem ser

clonados em um vetor *shuttle*, por exemplo, pHT3101 (Lerecius et al. (1989) *FEMS Microbiol. Letts.* 60: 211-218. O vetor *shuttle* pHT3101 contendo a sequência de codificação para o gene da proteína pesticida em particular pode, por exemplo,
5 ser transformado no *Bacillus* colonizador de raiz por meio de eletroporação (Lerecius et al. (1989) *FEMS Microbiol. Letts.* 60: 211-218).

Sistemas de expressão podem ser concebidos de modo que as
10 proteínas pesticidas são secretadas para fora do citoplasma de bactérias gram-negativas, como *E. coli*, por exemplo. As vantagens de ter proteínas pesticidas secretadas são: (1) prevenção de potenciais efeitos citotóxicos da proteína pesticida expressa e (2) melhoria da eficiência de
15 purificação da proteína pesticida, incluindo mas não se limitando a, um aumento na eficiência na recuperação e purificação da proteína pelo volume de cultura de células e diminuição do tempo e/ou custos na recuperação e purificação por unidade da proteína.

20 As proteínas pesticidas podem ser feitas para serem secretadas em *E. coli*, por exemplo, através da fusão de um peptídeo sinal adequado de *E. coli* ao final amino-terminal da proteína pesticida. Peptídeos sinal reconhecidos por *E. coli*
25 podem ser encontrado em proteínas já conhecidas por serem secretadas em *E. coli*, por exemplo, a proteína OmpA (Ghrayeb et al. (1984) *EMBO J.* 3:2437-2442). OmpA é uma proteína

majoritária na membrana externa de *E. coli* e, portanto, seu peptídeo sinal é tido como sendo eficiente no processo de translocação. Além disso, o peptídeo sinal de OmpA não precisa ser modificado antes do processamento como pode ser o caso de outros peptídeos sinal, por exemplo o peptídeo sinal de lipoproteína (Duffaud et al. (1987) *Meth. Enzymol.* 153: 492).

As proteínas pesticidas dos melhoramentos podem ser fermentadas em uma bactéria hospedeira e a bactéria resultante processada e usada como um *spray* microbiano da mesma forma que as linhagens de *Bt* foram usadas como *sprays* de inseticida. No caso de uma proteína pesticida (s) que é secretada por *Bacillus*, o sinal de secreção é removido ou transformado através de procedimentos conhecido na arte. Tais mutações e/ou supressões impedem a secreção da proteína pesticida (s) no meio de crescimento durante o processo de fermentação. As proteínas pesticidas são mantidas dentro da célula e as células são então processadas para produzir as proteínas pesticidas encapsuladas. Qualquer microorganismo adequado pode ser usado para esta finalidade. *Pseudomonas* tem sido usada para expressar toxinas *Bt* encapsuladas como as proteínas e as células resultantes processadas e pulverizadas como um inseticida (Gaertner et al. (1993), in: *Advanced Engineered Pesticides*, ed. Kim).

Alternativamente, as proteínas pesticidas são produzidas pela introdução de um gene heterólogo em um hospedeiro celular. A expressão do gene heterólogo resulta, direta ou indiretamente, na produção intracelular e manutenção dos pesticidas. Estas células são então tratadas em condições que prolongam a atividade da toxina produzida na célula quando a célula é aplicada ao ambiente das pragas-alvo (s). O produto resultante retém a toxicidade da toxina. Estas proteínas pesticidas naturalmente encapsuladas podem então ser formuladas de acordo com as técnicas convencionais para aplicação em um ambiente de hospedagem das pragas alvo, por exemplo, solo, água e folhagem das plantas. Veja, por exemplo EPA 0192319, e as referências aí citadas.

Nos melhoramentos, um microorganismo transformado (que inclui o organismo inteiro, células, esporos (s), proteína pesticida (s), componente pesticida (s), componentes de impacto de pragas (s), mutante (s), células vivas ou mortas e componentes das células, incluindo misturas de células vivas e mortas e componentes celulares, incluindo células quebradas e componentes celulares) ou uma proteína pesticida isolada podem ser formulados com um carreador aceitável em uma composição pesticida (s) que é, por exemplo, uma suspensão, uma solução, uma emulsão, um pó, grânulos dispersíveis ou um precipitado, um pó molhável, e um concentrado emulsionável, um aerossol ou *spray*, um grânulo impregnado, um adjuvante, uma pasta revestidora, um colóide, e também encapsulações

sobre, por exemplo, substâncias poliméricas. Essas composições formuladas podem ser preparadas por meios convencionais, tais como desidratação, liofilização, homogeneização, extração, filtração, centrifugação, 5 decantação, ou concentração de uma cultura de células que compõem o polipeptídeo.

Tais composições divulgadas acima podem ser obtidas pela adição de um agente superfície-ativo, um veículo inerte, um 10 conservante, um umectante, um estimulante de alimentação, um atrativo, um agente encapsulante, um ligante, um emulsificante, um corante, um protetor UV, um tampão, um agente de fluxo ou fertilizante, doadores de micronutrientes, ou outras preparações que influenciem o crescimento das 15 plantas. Um ou mais agrotóxicos, incluindo, mas não se limitando a, herbicidas, inseticidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, moluscicidas, acaricidas, reguladores de crescimento vegetal, aditivos de cultivo, e fertilizantes, podem ser combinados com os carreadores, 20 surfactantes ou adjuvantes habitualmente utilizados na arte de formulação ou outros componentes para facilitar o manuseio do produto e aplicação para pragas-alvo particulares. Carreadores e adjuvantes apropriados podem ser sólidos ou líquidos, e correspondem à substâncias normalmente empregadas 25 na tecnologia da formulação, por exemplo, substâncias minerais, naturais ou regeneradas, solventes, dispersantes, agentes de molhamento, melhoradores, ligantes, ou

fertilizantes. Os ingredientes ativos dos melhoramentos são normalmente aplicados na forma de composições e podem ser aplicados na área da cultura, nas plantas ou sementes a serem tratadas. Por exemplo, as composições dos melhoramentos podem
5 ser aplicadas nos grãos em preparação ou durante o armazenamento em um escaninho ou silo de grãos, etc. As composições dos melhoramentos podem ser aplicadas simultaneamente ou em sucessão com outros compostos. Os métodos de aplicação de um ingrediente ativo dos
10 melhoramentos ou uma composição agroquímica dos melhoramentos que contenha pelo menos uma das proteínas pesticidas produzidas pelas linhagens de bactérias dos melhoramentos incluem, mas não estão limitadas a, aplicação foliar, revestimento de sementes e aplicação do solo. O número de
15 aplicações e a taxa de aplicação dependem da intensidade de infestação pela praga correspondente.

Agentes superfície-ativos adequados incluem, mas não estão limitados a, compostos aniônicos como um carboxilato
20 de, por exemplo, um metal, um carboxilato de um ácido graxo de cadeia longa; um N-acilsarcosinato; mono ou di-ésteres de ácido fosfórico com alcoóis graxos etoxilados ou sais de tais ésteres; alcoóis graxos sulfatados, tais como dodecil sulfato de sódio, octadecil sulfato de sódio ou cetil sulfato de
25 sódio, sulfatos álcool graxo etoxilado; sulfatos alquilfenóis etoxilados; sulfonatos de lignina; sulfonatos de petróleo; aril alquil sulfonatos, tais como os sulfonatos de alquil-

benzeno ou sulfonatos alquilnaftaleno inferiores, por exemplo, butil naftaleno sulfonato; sais formaldeído-naftalenos sulfonados condensados; sais de fenol-formaldeído sulfonado condensados; sulfonatos mais complexos, tais como

5 sulfonatos de amido, por exemplo, o produto da condensação sulfonada de ácido oléico e N-metil taurina, ou os dialquil sulfo-succinatos, por exemplo, o sulfonato de sódio ou dioctil succinato. Os agentes não-iônicos incluem produtos da condensação de ésteres de ácidos graxos, alcoóis graxos,

10 amidas de ácidos graxos ou fenóis alquenila-alkuil- ou alquenil-substituídos com óxido de etileno, ésteres graxos de éteres de alcoóis polihídricos, por exemplo, ésteres de ácido graxos de sorbitano, produtos de condensação de tais ésteres com óxido de etileno, por exemplo, ésteres de ácidos graxos

15 sorbitar polioxietileno, os copolímeros em bloco de óxido de etileno e óxido de propileno, glicóis acetilênicos como 2,4,7,9-tetraetila-5-decino-4,7-diol, ou glicóis acetilênicos etoxilados. Exemplos de agentes superfície-ativos catiônicos incluem, por exemplo, um alifáticos mono-, di- ou poliamina

20 como um acetato, naftaleno ou oleato, ou amina contendo oxigênio como um óxido de amina de alquilamina polioxietileno; uma amina amida-ligada preparada pela condensação de um ácido carboxílico com um di-ou poliamina, ou um sal de amônio quaternário.

25

Exemplos de materiais inertes incluem mas não estão limitados aos minerais inorgânicos tais como caulim,

filossilicatos, carbonatos, sulfatos, fosfatos, ou materiais botânicos como a cortiça, espigas de milho em pó, casca de amendoim, casca de arroz e cascas de noz.

5 As composições dos melhoramentos podem estar em uma forma adequada para aplicação direta ou como um concentrado de composição primária que requer diluição com uma quantidade adequada de água ou outro diluente antes da aplicação. A concentração de pesticida, pode variar dependendo da natureza
10 da formulação especial, especificamente, se ele é um concentrado ou para ser usado diretamente. A composição contém 1 a 98% de um veículo inerte sólido ou líquido, e de 0 a 50% ou 0,1 a 50% de um surfactante. Essas composições serão administradas à taxa rotulada para o produto comercial, por
15 exemplo, cerca de 0,01 lb-5.0 lb por acre quando na forma seca e em cerca de 0,01 pts. - 10 pts. por acre quando na forma líquida.

20 Em um melhoramento adicional, as composições, bem como os microorganismos transformados e proteínas pesticidas dos melhoramentos, podem ser tratadas antes da formulação para prolongar a atividade pesticida, quando aplicada ao meio ambiente de uma praga alvo, desde que o pré-tratamento não seja prejudicial para a atividade dos pesticidas. Esse
25 tratamento pode ser por processos químicos e/ou processos físicos, enquanto o tratamento não afeta de forma deletéria as propriedades da composição (s). Exemplos de reagentes

químicos incluem, mas não estão limitados aos agentes de halogenização; aldeídos tais como formaldeído e glutaraldeído; anti-infecciosos, tais como o cloreto de Zefiran; alcoóis, como etanol e isopropanol e fixadores histológicos, como fixador de Bouin e fixador Helly (ver ,
5 por exemplo, Humason (1967) *Animal Tissue Techniques* (WH Freeman and Co.).

Em outros melhoramentos, pode ser vantajoso se tratar os
10 polipeptídeos de toxinas Cry com uma protease, por exemplo tripsina, para ativar a proteína previamente à aplicação de uma composição de proteína pesticida dos melhoramentos ao ambiente da praga alvo. Métodos para a ativação de inseticida por uma serina protease são bem conhecidos na arte. Veja, por
15 exemplo, Cooksey (1968) *Biochem. J.* 6:445-454 e Carroll e Ellar (1989) *Biochem. J.* 261:99-105, os ensinamentos dos quais são aqui incorporados por referência. Por exemplo, um protocolo de ativação adequada inclui, mas não está limitado a, combinar-se um polipeptídeo para ser ativado, por exemplo,
20 um novo polipeptídeo Cry purificado (por exemplo, com a sequência de aminoácidos demonstrada na SEQ ID NO: 2), e tripsina a uma razão de peso de 1/100 de proteína/tripsina em 20 NaHCO₃ mM, pH 8 e digerindo a amostra a 36°C por 3 horas.

25 As composições (incluindo os microorganismos transformados e proteínas pesticidas dos melhoramentos) podem ser aplicadas no ambiente de uma praga de insetos através de,

por exemplo, pulverização, atomização, espalhamento, dispersão, revestindo ou derramando, dentro ou sobre o solo, introduzindo na água de irrigação, pelo tratamento de sementes ou por aplicação geral ou se espalhando o pó no

5 momento em que a praga tenha começado a aparecer, ou antes do aparecimento de pragas, como medida de proteção. Por exemplo, a proteína pesticida e/ou microorganismos transformados dos melhoramentos podem ser misturados com grãos para proteger os grãos durante o armazenamento. Em geral, é importante se

10 obter um bom controle de pragas nas fases iniciais de crescimento da planta, pois este é o momento em que a planta pode ser mais severamente danificada. As composições dos melhoramentos podem, convenientemente, conter outro inseticida, se isso for considerado necessário. Em um

15 melhoramento, a composição é aplicada diretamente ao solo, em uma época de plantio, na forma granular de uma composição de células carreadoras e mortas de uma linhagem de *Bacillus* ou microorganismo transformado dos melhoramentos. Outro melhoramento é uma forma granular de uma composição

20 compreendendo um agroquímico, como, por exemplo, um herbicida, um inseticida, um fertilizante, um veículo inerte, e as células mortas de uma linhagem de *Bacillus* ou microorganismo transformado das incorporações.

25 Aqueles hábeis na arte vão reconhecer que nem todos os compostos são igualmente eficazes contra todas as pragas. Compostos de melhoramentos exibem atividades contra pragas de

insetos, que podem incluir agrônômicos economicamente importantes, florestas, estufa, viveiro, plantas ornamentais, alimentos e fibras, saúde pública e animal, a estrutura comercial e doméstica, membros de família, e pragas de produtos armazenados. Os insetos selecionados incluem insetos

5 das ordens Coleóptera, Díptera, Himenóptera, Lepidóptera, Mallophaga, Homóptera, Hemíptera, Ortóptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc., principalmente Coleóptera e Lepidóptera.

10

As larvas da ordem Lepidóptera incluem, mas não estão limitadas a, lagartas-cartucho, lagartas-roscas, mede-palms e mariposas da família Noctuidae *Spodoptera frugiperda* JE Smith (lagarta-cartucho-de-outono); *S. exigua* Hübner

15 (lagarta-cartucho-da-beterraba); *S. litura* Fabricius (lagarta-do-tabaco, lagarta-de-grupo, *cluster caterpillar*); *Mamestra configurata* Walker (lagarta-cartucho Bertha); *M. brassicae* Linnaeus (traça-do-repolho); *Agrotis ipsilon* Hufnagel (lagarta-roscas); *A. orthogonia* Morrison (lagarta-do-

20 oeste); *A. subterranea* Fabricius (lagarta-granulada, *granulated cutworm*); *Alabama argillacea* Hübner (lagarta-de-folha-de-algodão); *Trichoplusia ni* Hübner (lagarta-mede-palmo-de-repolho), *Pseudoplusia includens* Walker (lagarta-da-soja); *Anticarsia gemmatilis* Hübner (lagarta-de-mucuna);

25 *Hypena scabra* Fabricius (lagarta-verde-do-trevo, *green cloverworm*), *Heliothis virescens* Fabricius (lagarta-da-maça, *tobacco budworm*); *Pseudaletia unipuncta* Haworth (lagarta-

- cartucho); *Athetis mindara* Barnes e McDunnough (lagarta-de-pele-áspera, *rough skinned cutworm*); *Euxoa messoria* Harris (lagarta-de-lateral-escura, *darksided cutworm*); *Earias insulana* Boisduval (lagarta-espinhosa, *spiny bollworm*);
- 5 *vittella* Fabricius (lagarta-manchada, *spotted bollworm*); *Helicoverpa armigera* Hübner (lagarta-americana); *H. zea* Boddie (lagarta-da-espiga-de-milho ou lagarta-do-algodão); *Melanchra picta* Harris (lagarta-zebra, *zebra caterpillar*); *Egira* (*Xylomyges*) *curialis* Grote (lagarta-de-citros);
- 10 perfuradores, mariposas, mariposas-de-teia (*webworms*), vermes-coníferos (*coneworms*) e lepidópteros da família Pyralidae *Ostrinia nubilalis* Hübner (broca-do-milho-europeu); *Amyelois transitella* Walker (lepdóptero-de-laranja, *naval orangeworm*), *Anagasta kuehniella* Zeller (mariposa-farinha-do-
- 15 Mediterrâneo); *Cadra cautella* Walker (mariposa-da-amêndoa); *Chilo suppressalis* Walker (broca-do-colmo-do-arroz); *C. partellus* (broca-do-sorgo), *Corcyra cephalonica* Stainton (mariposa-de-arroz); *Crambus caliginosellus* Clemens (mariposa-da-teia-de-raíz-de-milho, *corn root webworm*);
- 20 *teterrellus* Zincken (mariposa-da-teia-de-agrostis, *webworm bluegrass*); *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée (enrolador-de-folha-de-arroz, *rice leaf roller*); *Desmia funeralis* Hübner (cigarrinha-dobrador-de-folha-de-uva, *grape leaf folder*); *Diaphania hyalinata* Linnaeus (mariposa-do-melão, *melon worm*);
- 25 *D. nitidalis* Stoll (cucurbitáceas); *Diatraea grandiosella* Dyar (broca-do-milho-do-sudoeste, *southwestern corn borer*), *D. saccharalis* Fabricius (broca-de-cana-de-açúcar, *surgarcane*

borer); *Eoreuma loftini* Dyar (broca-de-arroz-mexicano);
Ephestia elutella Hübner (mariposa-do-tabaco (cacau));
Linnaeus mellonella *Galleria* (traça-da-cera) ; *Herpetogramma*
licarsisalis Walker (mariposa-da-teia-do-relvado, sod
 5 webworm); *Homoeosoma electellum* Hulst (mariposa-do-girassol);
Elasmopalpus lignosellus Zeller (lagarta-de-elasma, lesser
 cornstalk borer); *Achroia grisella* Fabricius (mariposa-da-
 cera, lesser wax moth); *Loxostege sticticalis* Linnaeus
 (mariposa-de-teia-da-beterraba, beet webworm); *Orthaga*
 10 *thyrisalis* Walker (mariposa-de-teia-da-árvore-do-chá, tea
 tree web moth); *Maruca testulalis* Geyer (broca-da-vagem-do-
 feijão); *Plodia interpunctella* Hübner (mariposa-de-refeição
 indiana, Indian meal moth); *Scirpophaga incertulas* Walker
 (broca-da-haste amarela); *Udea rubigalis* Guenée (mariposa-
 15 laçadora-de-folha-de-aipo, celery leaftier) e lagartas-
 enroladeiras, lagartas-de-broto (budworms), lagartas-de-
 sementes, lagartas-de-frutas na família Tortricidae *Acleris*
gloverana Walsingham (tortricídeo-de-broto-da-cabeça-preta-
 ocidental); *A. variana* Fernald (tortricídeo-de-broto-de-
 20 cabeça-preta-oriental); *Archips argyrospila* Walker
 (tortricídeo-enrolador-de-folhas de árvores frutíferas); *A.*
Rosana Linnaeus (tortricídeo-enrolador-de-folha-europeu) e
 outras espécies de *Archips*, *Adoxophyes orana* Fischer von
 Rösslerstamm (mariposa-tortricídeo-de-fruta-de-verão);
 25 *Cochylis hospes* Walsingham (mariposa-listrada-do-girassol,
 banded sunflower moth); *Cydia latiferreana* Walsingham
 (mariposa-do-avelã, filbertworm); *C. pomonella* Linnaeus

- (mariposa-de-codificação, *coding moth*); *Platynota flavedana* Clemens (cigarrinha-enroladeira-variegada, *variegated leafroller*); *P. stultana* Walsingham (cigarrinha-enroladeira-onívora, *omnivorous leafroller*) ; *Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller (mariposa-de-vinhedo-européia, *European grape vine moth*); *Spilonota ocellana* Denis & Schiffermüller (mariposa-do-olho-manchado, *eyespotted moth*); *Endopiza viteana* Clemens (mariposa-da-uva, *grape berry moth*); *Eupoecilia ambiguella* Hübner (mariposa-da-vinha, *vine moth*);
- 10 *Bonagota salubricola* Meyrick (lagarta-enroladeira-de-folha-de-maça-Brasileira); *Grapholita molesta* Busck (mariposa-da-fruta-oriental); *Suleima helianthana* Riley (mariposa-de-broto-de-girassol); *Argyrotaenia* spp.; *Choristoneura* spp ..
- 15 Outras pragas agronômicas selecionadas da ordem Lepidóptera incluem, mas não estão limitadas a, *Alsophila pometaria* Harris (lagarta-de-necrose-de-outono, *fall cankerworm*); *Anarsia lineatella* Zeller (broca-de-galho-de-pêssego); *Anisota senatoria* JE Smith (lagarta-de-carvalho-com-listras-laranja, *orange striped oakworm*); *Antheraea pernyi* Guérin-Méneville (traça-da-seda-de-carvalho-chinês);
- 20 *Bombyx mori* Linnaeus (traça-da-seda); *Bucculatrix thurberiella* Busck (mariposa-perfuradora-de-folhas-de-algodão); *Colias eurytheme* Boisduval (lagarta-da-alfafa);
- 25 *Datana integerrima* Grote & Robinson (lagarta-da-nogueira); *Dendrolimus sibiricus* Tschetwerikov (mariposa-de-seda-da-Sibéria), *Ennomos subsignaria* Hübner (lagarta-mede-palmo-de-

ulmeiro, elm spanworm); *Erannis tiliaria* Harris (lagarta-
 mede-palmo-de-tília, linden looper); *Euproctis chrysorrhoea*
 Linnaeus (mariposa-de-extremidade-marron, browntail moth);
Harrisina americana Guérin-Méneville (lepdóptero-de-folha-de-
 5 uva, grapeleaf skeletonizer); *Hemileuca oliviae* Cockrell
 (lagarta-intervalo); *Hyphantria cunea* Drury (mariposa-de-
 teia-de-outono); *Keiferia lycopersicella* Walsingham (traça-
 do-tomate); *Lambdina fiscellaria fiscellaria* Hulst (lagarta-
 mede-palmo-de-cicuta-oriental, Eastern hemlock looper); *L.*
 10 *fiscellaria lugubrosa* Hulst (lagarta-mede-palmo-de-cicuta-
 ocidental Western hemlock looper); *Leucoma salicis* Linnaeus
 (mariposa-de-cetim); *Lymantria dispar* Linnaeus (mariposa-
 cigana); *Manduca quinquemaculata* Haworth (traça-falcão-de-
 cinco-pontos, mandarová-de-tomate); *M. sexta* Haworth
 15 (mandarová-de-tomate, mandarová-de-tabaco); *Operophtera*
brumata Linnaeus (mariposa-do-inverno); *Paleacrita vernata*
 Peck (lagarta-de-necrose-da-primavera, springer cankerworm);
Papilio cresphontes Cramer (papilionídeo-andorinha-gigante,
 giant swallowtail, orange dog); *Phryganidia californica*
 20 Packard (lagarta-de-carvalho-da-Califórnia), *Phyllocnistis*
citrella Stainton (lepdóptero-minador-dos-citros); *Fabricius*
blancardella Phyllonorycter (lepdóptero-minador-tentiforme-
 manchado, spotted tentiform leafminer); *Pieris brassicae*
 Linnaeus (borboleta-branca-grande); *P. rapae* Linnaeus
 25 (borboleta-branca-pequena); *P. napi* Linnaeus (borboleta-
 branca-de-nervuras-verdes); *Platyptilia carduidactyla* Riley
 (mariposa-da-alcachofra, artichoke plume moth), *Plutella*

xylostella Linnaeus (traça-das-crucíferas); *Pectinophora*
gossypiella Saunders (lagarta-rosada); *Pontia* *protodice*
 Boisduval & Leconte (lagarta-do-repolho-do-sul, *Southern*
cabbageworm); *Sabulodes* *aegrotata* Guenée (lagarta-mede-palmo-
 5 onívora); *Schizura* *concinna* JE Smith (lagarta-da-corcunda-
 vermelha, *red humped caterpillar*); *Sitotroga* *cerealella*
 Olivier (traça-de-grãos-de-Angoumois); *Thaumetopoea*
pityocampa Schiffermuller (lagarta-processionária-do-
 pinheiro); *Tineola* *bisselliella* Hummel (mariposa-desfiadora-
 10 de-roupa, *webbing clothesmoth*); *Tuta* *absoluta* Meyrick (traça-
 do-tomateiro); *Yponomeuta* *padella* Linnaeus (traça-do-
 arminho); *Heliothis* *subflexa* Guenée; *Malacosoma* spp. e *Orgyia*
 spp.

15 De interesse são larvas e adultos da ordem Coleóptera,
 incluindo besouros da família *Cerambycidae*, *Bruchidae* e
Curculionidae (incluindo, mas não se limitando a: *Anthonomus*
grandis Boheman (bicudo); *Lissorhoptrus* *Kuschel* *oryzophilus*
 (gorgulho-aquático); *Sitophilus* *granarius* Linnaeus (gorgulho-
 20 de-celeiro); *S. oryzae* Linnaeus (gorgulho-do-arroz); *Hypera*
punctata Fabricius (gorgulho-do-trevo); *Cylindrocopturus*
adpersus Leconte (gorgulho-do-caule-de-girassol); *Smicronyx*
fulvus Leconte (gorgulho-de-semente-de-girassol-vermelho); *S.*
sordidus Leconte (gorgulho-de-semente-de-girassol-cinza);
 25 *Sphenophorus* *maidis* Chittenden (curculionidae-de-milho));
 besouros pulga, besouros do pepino, crisomelídeo, besouros de
 folhas, besouros de batata e larvas da família *Chrysomelidae*

(incluindo, mas não se limitando a: *Leptinotarsa decemlineata* Say (besouro-de-batata-do-Colorado); *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (crisomelídeo-do-milho); *D. barberi* Smith & Lawrence (crisomelídeo-do-milho-do-norte); *D. undecimpunctata*
5 *howardi* Barber (vaquinha-do-sul); *Chaetocnema pulicaria* Melsheimer (besouro-pulga-de-milho); *Phyllotreta cruciferae* Goeze (besouro-pulga-de-milho); *Colaspis brunnea* Fabricius (besouro-de-uva); *Oulema melanopus* Linnaeus (besouro-de-folha-de-cereais); *Zygogramma exclamationis* Fabricius
10 (besouro-de-girassol)); besouros da família Coccinellidae (incluindo, mas não se limitando a: *Epilachna varivestis* Mulsant (besouro-de-feijão-mexicano)); besouros *chafers* e outros besouros da família Scarabaeidae (incluindo, mas não se limitando a: *Popillia japonica* Newman (besouro-japonês);
15 *Cyclocephala borealis* Arrow (besouro-mascarado-do-norte); *C. immaculata* Olivier (besouro-mascarado-do-sul); *Rhizotrogus majalis* Razoumowsky (besouro-europeu); *Phyllophaga crinita* Burmeister (corós), *Ligyris gibbosus* De Geer (besouro-de-cenoura)); besouros de tapete da família Dermestidae; vermes-de-cabo
20 (*wireworms*) da família Elateridae, *Eleodes* spp. *Melanotus* spp.; *Conoderus* spp.; *Limonius* spp.; *Agriotes* spp.; *Ctenicera* spp.; *Aeolus* spp.; coleópteros de casca da família Scolytidae e besouros da família Tenebrionidae.

25 Adultos e imaturos da ordem Diptera são de interesse, incluindo minadores *Agromyza parvicornis* Loew (minador-manchado-de-milho); mosquitos (incluindo, mas não se

limitando a: *Contarinia sorghicola* Coquillett (mosquito-de-sorgo); *Mayetiola destructor* Say (mosca-Hessian); *Sitodiplosis mosellana* Géhin (mosquito de trigo); *Neolasioptera murtfeldtiana* Felt (mosquito-de-semente-de-girassol)); moscas de frutas (Tephritidae), *Oscinella frit* Linnaeus (moscas, *frit flies*), vermes (incluindo, mas não limitados a: *Delia platura* Meigen (larva-de-trâmite); *D. coarctata* Fallen (mosca-de-bulbo-de-trigo) e outros *Delia* spp., *Meromyza americana* Fitch (larva-do-caule-de-trigo),
 10 *Musca domestica* Linnaeus (mosca-doméstica); *Fannia canicularis* Linnaeus, *F. femoralis* Stein (moscas-doméstica-menor, *lesser house flies*); *Stomoxys calcitrans* Linnaeus (moscas-estável, *stable flies*)); mosca-de-rosto, mosca-de-chifre (*horn flies*), moscas-de-sopro (*blow flies*), *Chrysomya*
 15 spp.; *Phormia* spp.; e outras pragas voadoras muscóides, mutucas, *Tabanus* spp.; moscas bot *Gastrophilus* spp.; *Oestrus* spp.; larvas-de-gado *Hipoderma* spp.; moscas-de-veados *Chrysops* spp.; *Melophagus ovinus* Linnaeus (*keds*) e outros Brachycera, os mosquitos *Aedes* spp.; *Anopheles* spp.; *Culex*
 20 spp.; moscas-pretas *Prosimulium* spp.; *Simulium* spp.; mosquitos-mordedores, moscas-de-areia, ascarídeos, Nematocera e outros.

Incluídos como insetos de interesse estão adultos e
 25 ninfas das ordens Hemíptera e Homoptera, tais como, mas não se limitando a, adalgídeos da família Adelgidae, insetos de planta da família Miríade, cigarras da família Cicadídea,

cigarrinhas, *Empoasca* spp.; da família Cicadellidae, percevejos das famílias Cixiidae, Flatidae, Fulgoroidea, Issidae e Delphacidae, cigarrinhas da família Membracidae, psilídeo da família Psyllidae, moscas da família Aleyrodidae, 5 afídeos da família Aphididae, filoxera da família Phylloxeridae, cochonilhas da família Pseudococcidae, hemípteros das famílias Asterolecanidae, Coccidae, Dactylopiidae, Diaspididae, Eriococcidae, Ortheziidae, Phoenicococcidae e Margarodidae, insetos-de-renda da família 10 Tingidae, percevejos da família Pentatomidae, percevejos, *Blissus* spp.; e outros insetos de sementes da família Lygaeidae, cigarrinhas da família Cercopidae insetos-de-polpa (*squash bugs*) da família Coreidae, e insetos-vermelhos e manchadores-de-algodão (*cotton stainers*) da família 15 Pyrrhocoridae.

Membros da ordem Homóptera agronomicamente importantes incluem ainda, mas não estão limitados a: *Acyrtosiphon pisum* Harris (pulgões-de-ervilha); *Aphis craccivora* Koch (pulgões-de-caupi); *A. fabae* Scopoli (pulgões-de-feijão-preto); *A. gossypii* Glover (pulgão-de-algodão, pulgão-de-melão); *A. maidiradicis* Forbes (pulgão-de-raiz-de-milho); *A. pomi* De Geer (afídeo-da-maçã); *A. spiraecola* Patch (afídeo-de-ulmeira); *Aulacorthum solani* Kaltenbach (pulgão-de-dedaleira); *Chaetosiphon fragaefolii* Cockerell (pulgão-de-morango); *Diuraphis noxia* Kurdjumov/Mordvilko (pulgão-de-trigo-russo); *Dysaphis plantaginea* Paaserini (pulgão-rosado-

da-maçã); *Eriosoma lanigerum* Hausmann (afídeo-lanoso);
Brevicoryne brassicae Linnaeus (pulgão-do-repolho);
Hyalopterus pruni Geoffroy (pulgão-pálido-da-ameixa);
Lipaphis erysimi Kaltenbach (pulgão-do-nabo); *Metopolophium*
5 *dirrhodum* Walker (afídeo-de-cereal), *Macrosiphum euphorbiae*
Thomas (pulgões-de-batata); *Myzus persicae* Sulzer (afídeo-da-
batata-pêssego, pulgão-do-pêssego-verde); *Nasonovia*
ribisnigri Mosley (pulgões-de-alface); *Pênfigo* spp. (pulgões-
de-raiz e pulgões-esfoladores, *root aphids and gall aphids*),
10 *Rhopalosiphum maidis* Fitch (pulgões-de-folha-de-milho); *R.*
padi Linnaeus (pulgão-de-carvalho-cereja-de-pássaro, *bird*
cherry-oat aphid); *Schizaphis graminum* Rondani (pulgão-
verde); *Sipha flava* Forbes (pulgão-de-cana-de-açúcar-
amarelo); *Sitobion avenae* Fabricius (pulgão-de-grão-Inglês);
15 *Therioaphis maculata* Buckton (pulgão-manchado-da-alfafa);
Toxoptera aurantii Boyer de Fonscolombe (pulgão-preto-do-
citrus) e *T. citricida* Kirkaldy (pulgão-preto); *Adelges* spp.
(*adelgids*); *Phylloxera devastatrix* Pergande (filoxera-de-noz-
pecã), *Bemisia tabaci* Gennadius (mosca-branca-do-tabaco,
20 mosca-branca-da-batata-doce); *B. argentifolii* Bellows &
Perring (mosca-branca-da-folha-prateada); *Dialeurodes citri*
Ashmead (mosca-branca-dos-citros); *Trialeurodes abutiloneus*
(mosca-branca-da-asa-bandeada, *bandedwinged whitefly*) e *T.*
vaporariorum Westwood (mosca-branca-das-estufas); *Empoasca*
25 *fabae* Harris (cigarrinha-da-batata); *Laodelphax striatellus*
Fallen (cigarrinha-marrom-menor); *Macrolestes quadrilineatus*
Forbes (cigarrinha-Aster); *Nephotettix cincticeps* Uhler

- (cigarrinha-verde); *N. nigropictus* Stål (cigarrinha-verde-do-arroz); *Nilaparvata lugens* Stål (cigarrinha-marrom); *Peregrinus maidis* Ashmead (cigarrinha-de-milho); *Sogatella furcifera* Horvath (cigarrinha-de-costas-branca); *Sogatodes orizicola* Muir (delfacídeo-do-arroz); *Typhlocyba pomaria* McAtee (cigarrinha-da-maçã-branca); *Erythroneoura* spp. (cigarrinhas-da-uva); *Magicicada septendecim* Linnaeus (cigarra-periódica); *Icerya purchasi* Maskell (homóptero-de-almofada-de-algodão); *Quadraspidiotus perniciosus* Comstock (homóptero-de-San Jose); *Planococcus citri* Risso (cochonilha-branca); *Pseudococcus* spp. (grupo de cochonilha-branca); *Cacopsylla pyricola* Foerster (psila-de-pêra); *Trioza diospyri* Ashmead (psila-de-caqui).
- 15 Espécies agronomicamente importantes de interesse da ordem Hemiptera incluem, mas não estão limitadas a: *Acrosternum hilare* Say (percevejo-verde); *Anasa tristis* De Geer (percevejo-de-abóbora); *Blissus leucopterus* Say (percevejo-das-gramíneas); *Corythuca gossypii* Fabricius (percevejo-de-renda); *Cyrtopeltis modesta* Distant (percevejo-do-tomate); *Dysdercus suturellus* Herrich-Schäffer (manchadores-do-algodão); *Euschistus servus* Say (percevejo-marrom); *E. variolarius* Palisot de Beauvois (percevejo-de-uma-mancha, *one-spotted stink bug*); *Graptostethus* spp. (grupo de percevejos-de-semente); *Leptoglossus corculus* Say (percevejo-de-sementes-de-pinheiro-de-folha-pisada, *leaf-footed pine seed bug*); *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois

(percevejo-manchado-de-planta, *tarnished plant bug*); *L. hesperus* Knight (percevejo-manchado-de-planta-ocidental, *Western tarnished plant bug*); *L. pratensis* Linnaeus (percevejo-comum-de-campo); *L. rugulipennis* Poppius
 5 (percevejo-manchado-de-planta-europeu, *European tarnished plant bug*); *Lygocoris pabulinus* Linnaeus (hemíptero-verde-comum, *common green capsid*), *Nezara viridula* Linnaeus (percevejo-verde-do-sul); *Oebalus pugnax* Fabricius (percevejo-de-arroz); *Oncopeltus fasciatus* Dallas (percevejo-
 10 grande-das-Asclepiadáceas); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (cigarrinha-de-algodão).

Além disso, melhoramentos da presente invenção podem ser eficazes contra Hemíptera, *Calocoris norvegicus* Gmelin
 15 (percevejo-de-morango, *strawberry bug*); *Orthops campestris* Linnaeus; *Plesiocoris rugicollis* Fallen (hemíptero-de-maça, *apple capsid*); *Cyrtopeltis modestus* Distant (percevejo-de-tomate, *tomato bug*); *Cyrtopeltis notatus* Distant (mosca-sugadora, *suckfly*); *Spanagonicus albofasciatus* Reuter
 20 (cigarrinha-de-marca-branca, *whitemarked fleahopper*); *Diaphnocoris chlorionis* Say (*honeylocust plant bug*); *Labopidicola allii* Knight (percevejo-da-planta-da-cebola, *onion plant bug*); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (cigarrinha-de-algodão); *Adelphocoris rapidus* Say (percevejo-
 25 rápido-de planta, *rapid plant bug*); *Poecilocapsus lineatus* Fabricius (percevejo-fitofago-de-quatro-listras, *four-lined plant bug*); *Nysius ericae* Schilling (percevejo-falso, *false*

chinch bug); *Nysius raphanus* Howard (percevejo-falso, *false chinch bug*); *Nezara viridula* Linnaeus (percevejo-verde); *Eurygaster* spp.; *Coreidae* spp.; *Pyrrhocoridae* spp.; *Tinidae* spp.; *Blattellidae* spp.; *Reduviidae* spp.; e *Cimicidae* spp.

5

Também estão incluídos os ácaros adultos e as larvas da ordem Acari (ácaros), tais como *Aceria tosichella* Keifer (ácaro-do-enrolamento-do-trigo); *Petrobia latens* Müller (ácaro-do-bronzeamento-do-trigo, *brown wheat mite*); ácaros-aranha e os ácaros-vermelhos da família Tetranychidae, 10 *Panonychus ulmi* Koch (ácaro-vermelho-europeu); *Tetranychus urticae* Koch (ácaro-rajado); (*T. Mcdanieli* McGregor (ácaro-McDaniel); *T. cinnabarinus* Boisduval (ácaro-carmim); *T. turkestanii* Ugarov & Nikolski (ácaro-do-morango); ácaros-lisos 15 da família Tenuipalpidae, *Brevipalpus lewisi* McGregor (ácaro-liso-do-citrus, *citrus flat mite*); ácaros-ferrugem e ácaros-de-broto na família Eriophyidae e outros ácaros de alimentação foliar e ácaros importante na saúde humana e animal, ou seja, os ácaros da família Epidermoptidae, ácaros 20 do folículo da família Demodicidae, ácaros de grãos da família Glycyphagidae, e carrapatos na ordem Ixodidae. *Ixodes scapularis* Say (carrapato-de-veado); *I. holocyclus* Neumann (carrapato-da-paralisia-australiano); *Dermacentor variabilis* Say (carrapato-americano-do-cão); *Amblyomma americanum* 25 Linnaeus (carrapato-da-estrela-solitária) e sarna e ácaros de coceira nas famílias Psoroptidae, Pyemotidae e Sarcoptidae.

Os insetos da ordem Thysanura são de interesse, tais como *Lepisma saccharina* Linnaeus (*silverfish*); *Thermobia domestica* Packard (*firebrat*).

5 Pestes adicionais de artrópodes cobertas incluem: aranhas na ordem Araneae, como *Loxosceles reclusa* Gertsch & Mulaik (aranha-castanha-solitária) e a aranha *Latrodectus Fabricius* (aranha-viúva-negra) e centopéias na ordem Scutigeromorpha como *Scutigera coleoptrata* Linnaeus (centopéias-caseiras) .

10

Os insetos podem ser testados para a atividade pesticida de composições dos melhoramentos no início de estágios de desenvolvimento, por exemplo, como larvas ou outras formas imaturas. Os insetos podem ser criados em total escuridão em
15 cerca de 20°C a 30°C e de cerca de 30% para cerca de 70% de umidade relativa. Os bioensaios podem ser realizados conforme descrito no Czapla e Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83(6): 2480-2485. Os métodos de criação de larvas de insetos e realização de bioensaios são bem conhecidos daqueles com
20 competências normais na arte.

Uma grande variedade de técnicas de bioensaio é conhecida por um perito na arte. Os procedimentos gerais incluem adição de um composto ou organismo experimental para a fonte de
25 alimentação em um recipiente fechado. A atividade pesticida pode ser medida por, mas não está limitada a, mudanças na mortalidade, perda de peso, atração, repelência e outras

alterações físicas e comportamentais após a alimentação e exposição por um período de tempo adequado. Os bioensaios aqui descritos podem ser usados com qualquer praga de insetos na alimentação das larvas ou da fase adulta.

5

Os exemplos a seguir são apresentados a título de ilustração, e não por meio de limitação.

EXPERIMENTOS

10

Exemplo 1: Bioensaio para testar a atividade pesticida da toxina de *B. thuringiensis* contra insetos selecionados

Os bioensaios foram conduzidos para se avaliar os efeitos do peptídeo toxina inseticida *Bt*, estabelecido na SEQ ID NO: 2, contra broca-do-milho-europeu (*Ostrinia nubilalis*), lagarta-da-espiga-de-milho (*Helicoverpa zea*), lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*) da lagarta-do-cartucho-de-outono (*Spodoptera frugiperda*), lagarta-da-soja (*Pseudoplusia includens*) e lagarta-da-mucuna (*Anticarsia gemmatalis*). Os ensaios de alimentação foram realizados em uma dieta artificial contendo a proteína inseticida. A proteína inseticida foi aplicada topicamente usando-se uma dieta artificial lepidópteros-específica. A toxina foi aplicada a uma taxa de 0.3µg por 25µL de amostra por poço e deixada para secar. A proteína está em tampão 10 mM de carbonato e pH de 10. Uma larva recém-nascida foi colocada em cada poço para

alimentação *ad libitum*, durante 5 dias. Os resultados foram expressos como positivo para reações de larvas como desnutrição e/ou mortalidade. Os resultados foram expressos como negativos, se as larvas foram semelhantes ao controle negativo que é a dieta alimentar na qual o tampão acima foi aplicado sozinho.

Tabela 1: Resultados do bioensaio de alimentação para SEQ ID NO: 2

Insetos Testados	Resultado
Broca-do-milho-europeu (<i>Ostrinia nubilalis</i>)	+
Lagarta-da-espiga-de-milho (<i>Helicoverpa zea</i>)	+
lagarta-rosca (<i>Agrotis ipsilon</i>)	+
Lagarta-do-cartucho-de-outono (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	-
Lagarta-da-soja	+
Lagarta-da-mucuna	+

Exemplo 2: Bioensaio para testar a atividade pesticida da Toxina de *B. thuringiensis* contra Broca-amarela-do-caule

Preparação de insetos recém-nascidos

Adultos da broca-amarela-do-caule (*Scirpophaga incertulas* Walker) são recolhidos a partir dos campos de arroz (ARS Mandya e Tattaguppe farm) e engaiolados com plantas de arroz. Os adultos que sobrevivem por 3-4 dias, nestas condições postam ovos em massas em lâminas foliares. As massas de ovos são cuidadosamente cortadas com uma parcela da folha, e mantidas separado para incubação à temperatura ambiente em placas de Petri de plástico seladas. Os neonatos,

imediatamente após a eclosão, são utilizados para a realização dos bioensaios.

Preparação de segmentos de caule

5 As plantas de arroz transgênicas foram preparadas usando-se a toxina *Bt* dos melhoramentos. Os métodos de transformação de arroz são conhecidos na arte, tais como os protocolos estabelecidos no Hiei et al. (*Plant Journal* 1994, 6(2), 271-282).

10

Um perfilho de cada planta de arroz *Bt* (cada planta é um evento) de cerca de 55-60 dias de idade foi cortado na base e feito em cinco segmentos de igual tamanho (cerca de 2 centímetros). Todos os segmentos foram mantidos em uma placa de Petri com discos de papel de filtro estéril e umedecidos com água destilada. Da mesma forma, um controle não-*Bt* foi mantido para a comparação. Depois de dois dias 2-3 segmentos de eventos respectivos foram fornecidos à broca.

20 *Bioensaios*

Cinco broca-da-haste recém-nascidas foram cuidadosamente liberadas por evento com uma pequena escova em cada prato. As placas foram seladas com filme plástico para impedir a fuga das larvas. Todas as placas foram mantidas em uma bandeja, que foi colocada em uma grande cuba contendo água e mantida em condições de temperatura ambiente. Cada dia, todas as placas foram cuidadosamente abertas e seladas até o final da

observação para fornecer ar fresco e para remover o excesso de condensação, se houver.

Observações

5 As observações de mortalidade e crescimento larval foram feitas após 5 dias. Inicialmente, em cada prato, todos os segmentos de caule foram inspecionados para qualquer larva morta na superfície. Posteriormente, os segmentos de caule foram cortados longitudinalmente com uma lâmina de camada-
10 sábia (bainha por bainha) e observados para a presença de larvas vivas ou mortas no interior do tecido. As larvas sobreviventes permaneceram dentro dos túneis enquanto as larvas mortas eram pretas e lisas. O crescimento de larvas sobreviventes foi comparado visualmente para aquelas do
15 controle não-Bt. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados para 14 eventos de bioensaios com broca-amarela-de-caule

*Larva inoculada	Larva sobrevivente	% mortalidade	Observações
5	0	100%	Larvas mortas ficaram pretas
3	0	100%	Larvas mortas ficaram pretas, 2 larvas escaparam
3	0	100%	Larvas mortas ficaram pretas, 2 larvas escaparam
2	0	100%	Larvas mortas ficaram pretas, 3 larvas escaparam
5	0	100%	Larvas mortas ficaram pretas
4	0	100%	Larvas mortas ficaram pretas, 1 larva escapou

5	0	100%	Larvas mortas ficaram pretas
5	0	100%	Larvas mortas ficaram pretas
5	2	60%	Larvas mortas ficaram pretas, larvas vivas cresceram afetadas
4	2	50%	Larvas mortas ficaram pretas, larvas vivas cresceram afetadas, 1 larva escapou
5	3	40%	Larvas mortas ficaram pretas, larvas vivas cresceram sem ficarem afetadas
3	0	100%	Larvas mortas ficaram pretas, 2 larvas escaparam
5	0	100%	Larvas mortas ficaram pretas
3	0	100%	Larvas mortas ficaram pretas, 2 larvas escaparam

2 Todos os bioensaios foram inicialmente inoculados com 5 larvas, no entanto, os números são ajustados para refletir as larvas que escaparam.

5

Resumo

Cinco larvas foram liberadas para todos os ensaios e algumas larvas escaparam durante o ensaio, e o % de mortalidade foi calculado apenas com base nas larvas ainda no prato, no final do ensaio. Onze dos 14 eventos demonstraram 100% de mortalidade. Dois eventos apresentaram 50-60% de mortalidade com morbidade nas larvas sobreviventes. Um evento onde foi observada 40% de mortalidade também permitiu que as larvas sobreviventes se desenvolvessem normalmente.

15

Exemplo 3: Determinação da CL_{50} e EC_{50}

Bioensaios foram conduzidos para se determinar uma LC_{50} e EC_{50} do peptídeo toxina inseticida, estabelecidos na SEQ ID NO: 2, em broca-do-milho-europeu (*Ostrinia nubilalis*), lagarta-da-espiga-de-milho (*Helicoverpa zea*), lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*) e lagarta-cartucho-de-outono (*Spodoptera frugiperda*). Os ensaios de alimentação foram realizados em uma dieta artificial contendo a proteína inseticida. A proteína inseticida foi diluída com tampão 10 mM de carbonato pH 10 e com uma dieta de inseticida para dar uma concentração final de toxinas de 10000, 1000, 100, 10 e 1 ppm. Uma larva recém-nascida foi colocada em cada poço para alimentação *ad libitum*, durante 5 dias. Cada bioensaio foi feito com oito cópias de cada dose e o bioensaio foi repetido três vezes. Os resultados foram expressos em CL_{50} para a mortalidade e/ou EC_{50} por pesagem das larvas sobreviventes em cada concentração de toxinas.

Tabela 3: Resultados de LC_{50} e EC_{50}

Inseto testado	LC_{50} ng/cm ²	EC_{50} ng/cm ²
broca-do-milho-europeu	0,42	0,2
Lagarta-da-espiga-de-milho	122.3	31,25
Lagarta-rosca	>10000	60,57
Lagarta-cartucho-de-outono	Sem Atividade	Sem Atividade

Exemplo 4: Transformação de milho por bombardeamento de partículas e Regeneração de Plantas Transgênicas

Embriões imaturos de milho provenientes a partir de plantas de estufa doadoras são bombardeados com uma molécula de DNA contendo a sequência de nucleotídeos da toxina (por exemplo, SEQ ID NO: 1) operacionalmente ligada a um promotor da ubiquitina e ao gene marcador PAT selecionável (Wohlleben et al. (1988) *Gene* 70: 25-37), que confere resistência ao herbicida Bialaphos. Alternativamente, o gene marcador de seleção é fornecido em uma molécula de DNA separada. A transformação é feita como segue. As receitas de meios seguem abaixo.

Preparação do tecido-alvo

As espigas são descascadas e desinfestadas em 30% de alvejante Clorox bleach™ mais 0,5% de detergente Micro por 20 minutos, e lavadas duas vezes com água estéril. Os embriões imaturos são retirados e colocados com o lado do eixo do embrião para baixo (lado do escutelo para cima), 25 embriões por placa, em meio 560Y por 4 horas e em seguida, alinhados dentro da zona-alvo de 2,5 cm na preparação para o bombardeio.

Preparação de DNA

Um vetor plasmidial compreendendo uma sequência de nucleotídeos da toxina (por exemplo, SEQ ID NO: 1) operacionalmente ligado a um promotor da ubiquitina é feito. Por exemplo, um vetor de transformação adequado compreendendo um promotor UBI1 de *Zea mays*, uma UTR 5' de UBI1 e um íntron

UBI1, em combinação com um terminador PinII. Além disso, o vetor contém um gene marcador PAT selecionável dirigido por um promotor CAMV35S e inclui um terminador CAMV35S. Opcionalmente, o marcador de seleção pode residir em um plasmídeo separado. Uma molécula de DNA compreendendo uma seqüência de nucleotídeos da toxina, bem como um marcador selecionável PAT é precipitada para sobre pastilhas de tungstênio de 1,1 μm (diâmetro médio) utilizando-se um procedimento de precipitação com CaCl_2 como segue:

10

100 μL partículas de tungstênio preparadas em água

10 μL (1 μg) de DNA em tampão Tris EDTA (1 μg de DNA total)

100 μL de 2,5 M de CaCl_2

15

10 μL de 0,1 M de espermidina

20

Cada reagente é adicionado seqüencialmente para uma suspensão de partículas de tungstênio, enquanto mantidas no vortex multitubo. A mistura final é sonicada brevemente e deixada para incubação sobre agitação constante por 10 minutos. Após o período de precipitação, os tubos são centrifugados brevemente, o líquido retirado, e os precipitados lavados com 500 mL de etanol 100% e centrifugados por 30 segundos. Mais uma vez o líquido é removido, e 105 μL de etanol 100% é adicionado ao precipitado final de partículas de tungstênio. Para o bombardeamento de partículas, as partículas de tungstênio/DNA são brevemente

25

sonicadas e 10µL são pingados no centro de cada macro-carreador e deixados para secar por cerca de 2 minutos antes do bombardeio.

5 Tratamento da Arma de partículas

As placas de amostra são bombardeadas no nível # 4 em arma de partículas HE34 #-1 ou # HE34-2. Todas as amostras recebem um único tiro de 650 PSI, com um total de dez alíquotas retiradas de cada tubo de preparação
10 partículas/DNA.

Tratamento subsequente

Na sequência dos bombardeamentos, os embriões são mantidos em meio 560Y por 2 dias, em seguida, transferidos
15 para meio de seleção 560R contendo 3 mg/litro de Bialaphos e repicadas a cada 2 semanas. Após aproximadamente 10 semanas de seleção, os calos de clones seleção-resistentes são transferidos para meio 288J para iniciar a regeneração em plantas. Na sequência de maturação de embriões somáticos (2-4
20 semanas), embriões somáticos bem desenvolvidos são transferidos para um meio para a germinação e transferidos para a sala de cultura iluminada. Cerca de 7-10 dias depois, as plântulas em desenvolvimento são transferidas para meio 272V livre de hormônio em tubos por 7-10 dias até as mudas
25 estarem bem estabelecidas. As plantas são então transferidas para inserção em apartamentos (equivalente a pote de 2,5") contendo solo de envasamento e crescidas por 1 semana em uma

câmara de crescimento, e subsequente, crescidas por um período adicional de 1-2 semanas em casa de vegetação, e em seguida, transferidas para os vasos 600 clássicos (galão de 1,6) e crescidas até a maturidade. As plantas são monitoradas e marcadas para a expressão da toxina por ensaios conhecidos na arte ou como descritos acima.

Bombardeamento e Meios de Cultura

O meio de bombardeamento (560Y) compreende 4,0 g/L de sais basal N6 (SIGMA C-1416), 1,0 mL/L de vitamina Eriksson's Mix (1000x SIGMA-1511), 0,5 mg/L de tiamina HCl, 120,0 g/L de sacarose, 1,0 mg/L de 2,4-D, e 2,88 g/L de L-prolina (trazendo-se para o volume com H₂O destilada após ajuste de pH para 5,8 com KOH); 2,0 g/L de Gelrite™ (adicionada depois de se levar o volume com H₂O destilada) e 8,5 mg/L de nitrato de prata (adicionados após a esterilização do meio e à temperatura ambiente). Meio de seleção (560R) compreende 4,0 g/L de sais basal N6 (SIGMA C-1416), 1,0 mL/L de vitamina Eriksson's Mix (1000x SIGMA-1511), 0,5 mg/L de tiamina HCl, 30,0 g/L de sacarose e 2,0 mg/L de 2,4-D (trazendo-se o volume com H₂O destilada após ajuste de pH para 5,8 com KOH); 3,0 g/L de Gelrite™ (adicionado depois de se levar o volume com H₂O destilada) e 0,85 mg/L de nitrato de prata e 3,0 mg/L de Bialaphos (ambos adicionados após a esterilização do meio e à temperatura ambiente).

Meio de regeneração de planta (288J) compreende 4,3 g/L de sais MS (GIBCO 11117-074), 5,0 mL/L de solução de vitaminas MS (0,100 g de ácido nicotínico, 0,02 g/L de tiamina HCl, 0,10 g/L de piridoxina HCl, e 0,40 g/L de Glicina, trazendo-se o volume com H₂O D.I) (Murashige e Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15: 473), 100 mg/L de mio-inositol, 0,5 mg/L de zeatina, 60 g/L de sacarose e 1,0 mL/L de 0,1 mM de ácido abscísico (trazendo-se o volume com H₂O destilada após o ajuste do pH para 5,6), 3,0 g/L de Gelrite™ (adicionado-se depois de se levar o volume com H₂O destilada) e 1,0 mg/L de ácido indolacético e 3,0 mg/L de Bialaphos (adicionados após a esterilização do meio e resfriado a 60°C).

O meio livre de hormônios (272V) compreende 4,3 g/L de sais MS (GIBCO 11117-074), 5,0 mL/L de solução de vitaminas MS (0,100 g/L de ácido nicotínico, 0,02 g/L de tiamina HCl, 0,10 g/L de piridoxina HCl e 0,40 g/L de Glicina, trazendo-se o volume com H₂O destilada), 0,1 g/L de mio-inositol, e 40,0 g/L de sacarose (trazendo-se o volume com H₂O destilada após o ajuste do pH para 5,6) e 6 g/L de Bacto-ágar (adicionado depois de se levar o volume com H₂O destilada), esterilizado e resfriado a 60°C.

Exemplo 5: Transformação de Milho Mediada por *Agrobacterium* e Regeneração de Plantas Transgênicas

Para a transformação genética de milho mediada por *Agrobacterium* com uma sequência de nucleotídeos de toxinas (por exemplo, SEQ ID NO: 1), pode ser usado o método de Zhao (U.S. Patent No. 5,981,840, e publicação de patente PCT WO98/32326, cujo conteúdo é incorporado aqui por referência). Resumidamente, embriões imaturos são isolados de milho e os embriões colocados em contato com uma suspensão de *Agrobacterium* sob condições em que as bactérias são capazes de transferir a sequência de nucleotídeos da toxina (SEQ ID NO: 1) a pelo menos uma célula de pelo menos um dos embriões imaturos (etapa 1: a etapa de infecção). Nesta etapa, os embriões imaturos podem ser imersos em uma suspensão de *Agrobacterium* para o início da inoculação. Os embriões são co-cultivados por um tempo com o *Agrobacterium* (Etapa 2: a etapa de co-cultivo). Os embriões imaturos podem ser cultivados em meio sólido após a etapa de infecção. Na sequência deste período de co-cultivo uma etapa de descanso "opcional" é contemplada. Nesta etapa de descanso, os embriões são incubados na presença de, pelo menos, um antibiótico que inibe o crescimento de *Agrobacterium* sem a adição de um agente seletivo para plantas transformantes (Passo 3: etapa de descanso). Os embriões imaturos podem ser cultivados em meio sólido com antibiótico, mas sem um agente de seleção, para a eliminação de *Agrobacterium* e para uma fase de descanso par as células infectadas. Em seguida, os embriões inoculados são cultivados em meio contendo um agente seletivo e o calo transformado crescido é recuperado (Passo

4: a etapa de seleção). Os embriões imaturos são cultivados em meio sólido com um agente seletivo resultando no crescimento seletivo das células transformadas. O calo é, então, regenerado em planta (Passo 5: a etapa de regeneração) e calos cultivados em meio seletivo podem ser cultivados em meio sólido para regeneração das plantas.

Exemplo 6: Transformação de Embriões de Soja

10 Embriões de soja são bombardeados com um plasmídeo contendo a sequência de nucleotídeos de toxina da SEQ ID NO: 1 operacionalmente ligada a um promotor pinII como se segue. Para se induzir embriões somáticos, cotilédones, 3-5 mm em comprimento dissecados de sementes imaturas esterilizadas na superfície, de um cultivar de soja apropriado são cultivadas na luz ou no escuro a 26°C em meio ágar apropriado por seis a dez semanas. Embriões somáticos produzindo embriões secundários são excisados e colocados em um meio líquido adequado. Após seleção repetida para grupos de embriões somáticos que se multiplicam como embriões prematuros de estágio globular, as suspensões são mantidas como descrito abaixo.

25 Culturas embriogênicas de soja em suspensão podem ser mantidas em 35 mL de meio líquido em um agitador rotativo, a 150 rpm, a 26°C com luzes fluorescentes em uma programação de 16:8 horas dia/noite. As culturas são repicadas a cada duas

semanas pela inoculação de aproximadamente 35 mg de tecido em 35 mL de meio líquido.

Culturas embriogênicas de soja em suspensão podem então ser transformadas pelo método de arma de bombardeamento de partículas (Klein et al. (1987) *Nature (London)* 327: 70-73, U.S. Patent No. 4,945,050). Um instrumento Du Pont Biolistic PDS1000/HE (retro-ajuste de hélio) pode ser usado para estas transformações.

Um gene marcador de seleção que pode ser utilizado para facilitar a transformação de soja é um transgene composto do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (Odell et al. (1985) *Nature* 313: 810-812), o gene da higromicina fosfotransferase do plasmídeo pJR225 (de *E. coli*, Gritz et al. (1983) *Gene* 25: 179-188), e a região 3' do gene da nopalina sintase a partir do T-DNA do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. O cassete de expressão compreende uma sequência de nucleotídeos de toxina (por exemplo, SEQ ID NO: 1) operacionalmente ligada ao promotor pinII pode ser isolado como um fragmento de restrição. Este fragmento pode ser inserido em um sítio de restrição único do vetor portador do gene marcador.

Para 50 µL de uma suspensão a 60 mg/mL de partículas de ouro de 1 µm é acrescentado (em ordem): 5 µL de DNA (1 µg/µL), 20 µL de espermidina (0,1 M) e 50 µL de CaCl₂ (2,5

M). A preparação de partículas é, então, agitada por três minutos, centrifugada em uma microcentrífuga por 10 segundos e o sobrenadante removido. As partículas revestidas de DNA são então lavadas uma vez em 400 μ L de etanol 70% e
5 ressuspensas em 40 μ L de álcool anidro. A suspensão DNA/partículas pode ser sonicada três vezes por um segundo cada. Cinco microlitros das partículas de ouro revestidas com DNA são então carregados em cada disco transportador macro.

10 Cerca de 300-400 mg de uma suspensão de cultura de duas semanas é colocado em uma placa de Petri 60 x 15 mm vazia e o líquido residual removido do tecido com uma pipeta. Para cada experimento de transformação, aproximadamente 5-10 placas de tecidos são normalmente bombardeadas. A pressão de ruptura de
15 membrana é de 1100 psi, e a câmara é evacuada para um vácuo de 28 polegadas de mercúrio. O tecido é colocado cerca de 3,5 centímetros de distância da tela de retenção e bombardeado três vezes. Na sequência de bombardeamentos, o tecido pode ser dividido ao meio e colocado de volta em líquido e
20 cultivado como descrito acima.

Cinco a sete dias após o bombardeio, o meio líquido pode ser trocado por novos meios, e onze a doze dias após o bombardeio com meios frescos contendo 50 mg/mL de
25 higromicina. Este meio seletivo pode ser atualizado semanalmente. Sete a oito semanas após o bombardeio, o tecido transformado verde, pode ser observado crescendo de

aglomerados embriogênicos necróticos não transformados. Isolados de tecido verde são removido e inoculado em frascos individuais para gerar novas culturas de suspensões embriogênicas transformadas como propagados clonais. Cada
5 nova linhagem pode ser tratada como um evento de transformação independente. Estas suspensões podem ser repicadas e mantidas como "grupos" de embriões imaturos ou regenerados em plantas inteiras através da maturação e germinação dos embriões somáticos individuais.

10

Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes mencionados no caderno de especificações são indicativas do nível daqueles hábeis na arte à qual pertence esta invenção. Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes estão
15 aqui incorporadas por referência, na mesma medida, como se cada uma das publicações individuais, patente ou pedido de patente fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência.

20

Embora a invenção que precede tenha sido descrita em algum detalhe a título de ilustração e exemplo para fins de clareza de entendimento, será óbvio que determinadas alterações e modificações podem ser praticadas no âmbito dos melhoramentos.

25

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada por ser selecionada do grupo constituído por:

- 5 (a) uma molécula de ácido nucléico compreendendo a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1, ou a sequência complementar integral da mesma;
- (b) uma molécula de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ
10 ID NO: 2;
- (c) uma sequência de nucleotídeos que tenha pelo menos 80% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeos (a);
- (d) uma sequência de nucleotídeos que tenha pelo menos 85% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeos (a);
- 15 (e) uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos caracterizada por pelo menos 70% de identidade sequência com uma sequência de aminoácidos de (b);
- (f) uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína
20 que compreende uma sequência de aminoácidos caracterizada por pelo menos 75% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de (b).

2. Molécula de ácido nucléico isolada de acordo com a
25 reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a dita

seqüência de nucleotídeos é uma seqüência sintética que foi concebida para a expressão em uma planta.

3. Construto de DNA caracterizado pelo fato de que compreende
5 a molécula de ácido nucléico da reivindicação 1.

4. Construto de DNA de acordo com a reivindicação 3,
caracterizado pelo fato de que inclui ainda uma molécula de
ácido nucléico que codifica um polipeptídeo heterólogo.

10

5. Célula hospedeira caracterizada pelo fato de que contém o
construto de um DNA da reivindicação 3.

6. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 5,
15 caracterizada pelo fato de que é uma célula bacteriana.

7. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 5,
caracterizada pelo fato de que é uma célula vegetal.

20 8. Planta transgênica caracterizada pelo fato de que
compreende a célula hospedeira de acordo com a reivindicação
7.

9. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a dita planta é selecionada do grupo constituído por milho, sorgo, trigo, couve, girassol, tomate, crucíferas, pimentão, batata, algodão, arroz, soja,
5 beterraba sacarina, cana de açúcar, tabaco, cevada, e colza.

10. Semente transformada da planta de acordo com reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a semente compreende o construto de DNA.

10

11. Polipeptídeo isolado com atividade pesticida, caracterizado por ser selecionado a partir do grupo constituído por:

(a) um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos
15 de SEQ ID NO: 2;

(b) um polipeptídeo que é codificado pela sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1;

(c) uma sequência de polipeptídeo tendo pelo menos 80% de identidade de sequência com uma sequência de polipeptídeos de
20 acordo com (a) ou (b);

(d) uma sequência de polipeptídeo tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com uma sequência polipeptídica de acordo com (a) ou (b).

12. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por compreender ainda seqüências heterólogas de aminoácidos.

5 13. Composição caracterizada por compreender o polipeptídeo de acordo com a reivindicação 11.

14. Composição de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a dita composição é
10 selecionada a partir do grupo que consiste de um pó, poeira, pastilhas, granulados, spray, emulsões, colóides e solução.

15. Composição de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a dita composição é preparada
15 por secagem, liofilização, homogeneização, extração, filtração, centrifugação, decantação, ou concentração de uma cultura de células de *Bacillus thuringiensis*.

16. Composição de acordo com a reivindicação 13,
20 caracterizada por compreender de cerca de 1% a cerca de 99% em peso do referido polipeptídeo.

17. Método para controlar uma população de praga de lepidópteros ou de coleópteros, caracterizado pelo fato de
25 que compreende colocar uma dita população em contato com uma

quantidade de atividade pesticida eficaz de um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 11.

18. Método para matar uma praga de lepidópteros ou coleópteros, caracterizado pelo fato de que compreende colocar a dita praga em contato com, ou alimentar a dita praga com uma quantidade de atividade pesticida eficaz de um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 11.
19. Método para produzir um polipeptídeo com atividade pesticida, caracterizado por compreender cultivar a célula hospedeira da reivindicação 5, em condições em que uma molécula de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo é expressa, o dito polipeptídeo sendo selecionado a partir do grupo que consiste de:
- (a) um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2;
 - (b) um polipeptídeo que é codificado pela sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1;
 - (c) uma sequência de polipeptídeo tendo pelo menos 80% de identidade de sequência com uma sequência de polipeptídeos de (a) ou (b); e
 - (d) uma sequência polipeptídeo tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com uma sequência polipeptídica de (a) ou (b).

20. Planta caracterizada por ter estavelmente incorporado em seu genoma um construto de DNA constituído por uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína com atividade pesticida, onde a dita sequência de nucleotídeos é selecionada do grupo constituído por:

(a) uma molécula de ácido nucléico compreendendo a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1, ou a sequência complementar integral da mesma;

10 (b) uma molécula de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2;

(c) uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 80% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos de

15 (a);

(d) uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos de (a);

20 (e) uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos caracterizada por pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de (b); e

25 (f) uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos caracterizada por pelo menos 75% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de (b),

em que a dita seqüência de nucleotídeos é operacionalmente ligada a um promotor que dirige a expressão de uma seqüência de codificação em uma célula vegetal.

5 21. Planta de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a dita planta é uma célula vegetal.

22. Método para proteger uma planta contra uma praga, caracterizado pelo fato de que compreende introduzir na dita
10 planta ou célula vegetal desta, ao menos um vetor de expressão que compreende uma seqüência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo pesticida, onde a dita seqüência de nucleotídeos é selecionada do grupo constituído por:

(a) uma molécula de ácido nucléico compreendendo a seqüência
15 de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1, ou a seqüência complementar integral da mesma;

b) uma molécula de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2;

20 (c) uma seqüência de nucleotídeos que tenha pelo menos 80% de identidade de seqüência com uma seqüência de nucleotídeos de (a);

(d) uma seqüência de nucleotídeos que tenha pelo menos 85% de identidade de seqüência com uma seqüência de nucleotídeos de
25 (a);

(e) uma seqüência de nucleotídeos que codifica uma proteína que compreende uma seqüência de aminoácidos caracterizada por pelo menos 70% de identidade de seqüência com uma seqüência de aminoácidos de (b);

- 5 (f) uma seqüência de nucleotídeos que codifica uma proteína que compreende uma seqüência de aminoácidos caracterizada por pelo menos 75% de identidade de seqüência com uma seqüência de aminoácidos de (b).

- 10 23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a dita planta produz um polipeptídeo pesticida tendo atividade pesticida contra pragas de lepidópteros e coleópteros.

RESUMO

MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, CONSTRUTO DE DNA, CÉLULA
 HOSPEDEIRA, PLANTA TRANSGÊNICA, SEMENTE TRANSFORMADA,
 5 POLIPEPTÍDEO ISOLADO COM ATIVIDADE PESTICIDA, COMPOSIÇÃO,
 MÉTODO PARA CONTROLAR UMA POPULAÇÃO DE PRAGA DE LEPIDÓPTEROS
 OU DE COLEÓPTEROS, MÉTODO PARA MATAR UMA PRAGA DE
 LEPIDÓPTEROS OU COLEÓPTEROS, MÉTODO PARA PRODUZIR UM
 POLIPEPTÍDEO COM ATIVIDADE PESTICIDA, PLANTA, MÉTODO PARA
 10 PROTEGER UMA PLANTA CONTRA UMA PRAGA

A invenção fornece ácidos nucleicos, e variantes e
 fragmentos destes, obtidos a partir de linhagens de *Bacillus*
thuringiensis codificando polipeptídeos que tenham atividade
 15 pesticida contra pragas de insetos, incluindo Lepidoptera.
 Concretizações particulares da invenção fornecem ácidos
 nucleicos isolados que codificam proteínas pesticidas,
 composições pesticidas, construtos de DNA, microorganismos e
 plantas transformados contendo um ácido nucleico dos
 20 melhoramentos. Estas composições encontram uso de métodos
 para controlar pragas, especialmente pragas de plantas.