



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

(21) PI 0907100-8 A2



(22) Data do Depósito: 15/01/2009

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

(54) Título: CÉLULA VEGETAL, PLANTA OU PARTE DA PLANTA, SEMENTE TRANSGÊNICA E MÉTODO PARA CONTROLAR LEPIDOPTERA

(51) Int. Cl.: C12N 15/82.

(30) Prioridade Unionista: 09/01/2009 US 12/351,267; 17/01/2008 US 61/021,676; 17/01/2008 US 61/021,699.

(71) Depositante(es): PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.; E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY.

(72) Inventor(es): RAFAEL HERMANN; ALBERT L. LU; MARK NELSON; JAMES K. PRESNAIL; JANET A. RICE; MICHAEL LASSNER.

(86) Pedido PCT: PCT US2009031055 de 15/01/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/091862 de 23/07/2009

(85) Data da Fase Nacional: 01/07/2010

(57) Resumo: MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE UMA CÉLULA VEGETAL, PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA OU PARTE DE PLANTA E PARA CONTROLAR LEPIDOPTERA. São fornecidos métodos e composições os quais empregam um elemento de silenciamento que, quando ingerido por uma praga, como uma praga da ordem Lepidoptera, são capazes de diminuir a expressão de uma sequência alvo na praga. Em concretizações específicas, a diminuição na expressão da sequência alvo controla a praga e, assim, os métodos e composições são capazes de limitar os danos a uma planta. A presente invenção proporciona polinucleotídeos alvo codificando polipeptídeos de famílias de proteínas específicas e vários polinucleotídeos alvo estabelecidos nas SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 ou variantes e fragmentos das mesmas, onde uma diminuição na expressão de uma ou mais sequências na praga-alvo controla a praga (ou seja, tem atividade inseticida). Ainda são fornecidos elementos de silenciamento que, quando ingeridos pela praga diminuem o nível do polipeptídeo alvo e, assim, controlam a praga. Na concretização específica, a praga é Spodoptera frugiperda. Também são fornecidas plantas, parte das plantas, bactérias e outras células hospedeiras compreendendo os elementos de silenciamento ou uma variante ativa ou fragmento do mesmo, da invenção.

MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE UMA CÉLULA VEGETAL, PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA OU PARTE DE PLANTA E PARA CONTROLAR LEPIDOPTERA

CAMPO DA INVENÇÃO

- 5 A presente invenção refere-se geralmente aos métodos de biologia molecular e silenciamento de genes para controle de pragas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

- 10 Insetos pragas são um problema sério na agricultura. Eles destroem milhões de hectares de culturas alimentares como milho, soja, ervilha e algodão. Anualmente, essas pragas causam mais de 100 bilhões de dólares em danos às culturas somente nos Estados Unidos. Numa batalha sazonal contínua, os agricultores
- 15 devem aplicar bilhões de litros de pesticidas sintéticos para combater essas pragas. Outros métodos utilizados no passado distribuía atividade inseticida por microrganismos ou genes derivados de microrganismos presentes em plantas transgênicas. Por exemplo, certas espécies de microrganismos do gênero
- 20 *Bacillus* são conhecidas por possuírem atividade pesticida contra uma ampla gama de insetos pragas incluindo *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera*, entre outros. Na verdade, pesticidas microbianos, particularmente aqueles obtidos a partir de cepas de *Bacillus*, têm desempenhado um importante
- 25 papel na agricultura como alternativa ao controle químico de pragas. Cientistas agrícolas têm desenvolvido plantas cultivadas com resistência melhorada a insetos pela engenharia genética de plantas cultivadas para a produção de proteínas inseticidas de *Bacillus*. Por exemplo, plantas de milho e
- 30 algodão geneticamente modificadas para produzir toxinas Cry (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) são hoje amplamente utilizadas na agricultura americana e tem provido o agricultor com uma alternativa aos métodos tradicionais de controle de insetos. No entanto, estas proteínas inseticidas Bt apenas protegem as plantas de uma variedade relativamente limitada de pragas. Além disso, essas concretizações de atividade inseticida fornecem diferentes níveis de especificidade e, em alguns casos, causam significativo impacto ambiental. Assim, há uma necessidade imediata de métodos alternativos para o controle de pragas.

BREVE RESUMO DA INVENÇÃO

Métodos e composições são fornecidos que empregam um elemento de silenciamento que, quando ingerido por uma praga, tal como uma praga da ordem Lepidoptera, é capaz de diminuir a expressão de uma sequência alvo na praga. Em concretizações específicas, a diminuição na expressão da sequência alvo controla a praga e, assim, os métodos e as composições são capazes de limitar os danos de uma planta. A presente invenção proporciona polinucleotídeos alvo codificando diferentes polipeptídeos de famílias específicas divulgadas aqui e em vários outros polinucleotídeos alvo estabelecidos nas SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 ou variantes ativas ou fragmentos dos mesmos, em que uma diminuição na expressão de uma ou mais sequências nas pragas-alvo controla a praga (ou seja, tem atividade inseticida). Além disso, são fornecidos elementos de silenciamento, que quando ingeridos pela praga, diminuem o nível de expressão de um ou mais polinucleotídeos-alvo. Em concretizações específicas, o

elemento de silenciamento compreende pelo menos 15, 20 ou 22 nucleotídeos consecutivos de qualquer uma das SEQ ID NO:1-50. Em concretizações específicas, a praga que é controlada é *Spodoptera frugiperda*. São também fornecidas plantas, partes de plantas, células de plantas, bactérias e
5 outras células hospedeiras compreendendo os elementos de silenciamento ou uma variante ativa ou fragmento dos mesmos.

Em algumas concretizações, são providos métodos para obtenção de uma célula vegetal compreendendo transformar uma célula vegetal com um polinucleotídeo da invenção e cultivar a referida célula vegetal sob
10 condições de crescimento de célula vegetal. Métodos de obtenção de plantas ou partes de plantas compreendem o método acima e, adicionalmente, a etapa de regenerar uma planta ou parte de planta.

Em outra concretização, é fornecido um método para controlar uma praga, como uma praga da ordem Lepidoptera. O método inclui a alimentação
15 de uma praga com uma composição que inclui um elemento de silenciamento, no qual o elemento de silenciamento, quando ingerido pela praga, reduz o nível de uma sequência alvo na praga e, assim, controla a praga. São fornecidos métodos adicionais para proteger uma planta de uma praga. Esses métodos compreendem a introdução, na planta ou parte da planta, de
20 um elemento de silenciamento da invenção. Quando a planta expressando o elemento de silenciamento é ingerida pela praga, o nível da sequência alvo é diminuído e as pragas são controladas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção agora será descrita mais detalhadamente a
25 seguir, com referência aos desenhos que a acompanham, em que algumas, mas não todas as concretizações da invenção são mostradas. Na verdade, essas invenções podem ser incorporadas em muitas formas diferentes e não devem ser interpretadas como limitadas às concretizações aqui enunciadas, mas sim, estas concretizações são fornecidas para que essa divulgação
30 satisfaça os requisitos legais aplicáveis. Números são referidos como elementos-chave.

Muitas alterações e outras concretizações das invenções aqui estabelecidas virão à mente de um técnico no assunto para que essas invenções pertençam tendo o benefício dos ensinamentos apresentados nas descrições anteriores e nos
5 desenhos associados. Portanto, é preciso entender que as invenções não estão limitadas às concretizações específicas divulgadas e que modificações e outras concretizações estão destinadas a serem incluídas no âmbito das reivindicações anexadas. Apesar de termos específicos serem utilizados aqui,
10 são usados em um sentido genérico, descritivo e não apenas para efeitos de limitação.

I. Resumo

Métodos e composições são fornecidos para empregar um
15 elemento de silenciamento que, quando ingerido por uma praga, como uma praga da ordem Lepidoptera, é capaz de diminuir a expressão de uma sequência alvo na praga. Em concretizações específicas, a diminuição na expressão da sequência alvo controla a praga e, assim, os métodos e as composições são
20 capazes de limitar os danos de uma planta ou parte da planta. A presente invenção proporciona polinucleotídeos alvo que codificam polipeptídeos de uma variedade de classes de proteínas incluindo, por exemplo, um polipeptídeo do hormônio juvenil, um polipeptídeo vacuolar, um polipeptídeo caderina, um
25 polipeptídeo de cutícula, um fator de iniciação de tradução, um polipeptídeo SAR1, um fator de alongamento, um fosfoligosacarídeo, um polipeptídeo miosina, um transportador de aminoácido do canal de potássio, um polipeptídeo purificador de potássio internamente, um transportador de aminoácidos, um
30 polipeptídeo tubulina, um polipeptídeo ubiquitina, e uma pequena ribonucleoproteína nuclear. Em outras concretizações os

polinucleotídeos alvo são os estabelecidos nas SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 ou
5 variantes ativas e fragmentos dos mesmos. Elementos de silenciamento concebidos tendo em conta estes polinucleotídeos alvo são fornecidos que, quando ingeridos pela praga, diminuem a expressão de uma ou mais sequências alvo e, assim, controlam as pragas (ou seja, tem atividade inseticida). Veja, por
10 exemplo, SEQ ID NOS: 51-465.

Como usado aqui, por "controlar uma praga" ou "controle de uma praga" entende-se qualquer efeito sobre uma praga que resulta em limitar os danos que as pragas causam. Controlar uma praga inclui, mas não está limitado a, matar a praga, inibir o
15 desenvolvimento da praga, alterar a fertilidade ou o crescimento da praga de tal forma que a praga proporcione menos danos à planta, diminuindo o número de descendentes produzidos, produzindo pragas menos aptas, produzindo pragas mais suscetíveis ao ataque de predadores, ou inibindo as pragas de
20 comer a planta.

Por "resistência à doença" entende-se que as plantas evitam os sintomas da doença que são o resultado de interações patógeno-planta. Ou seja, patógenos são impedidos de causar doenças nas plantas e os sintomas associados às doenças, ou,
25 alternativamente, os sintomas da doença causada pelo patógeno são minimizados ou reduzidos.

A redução do nível de expressão do polinucleotídeo-alvo ou do polipeptídeo codificado assim, na praga, resulta na repressão, controle e/ou morte do organismo patogênico invasor.
30 Reduzindo o nível de expressão da sequência-alvo da praga irá reduzir os sintomas da doença resultantes da provocação do

patógeno, em pelo menos, cerca de 2% a pelo menos cerca de 6%, de pelo menos cerca de 5% a cerca de 50%, de pelo menos cerca de 10% a cerca de 60%, de pelo menos, cerca de 30% a cerca de 70%, de pelo menos cerca de 40% a cerca de 80%, ou, de pelo menos, cerca de 50% a cerca de 90% ou mais. Assim, os métodos da invenção podem ser utilizados para proteger plantas de doenças, particularmente estas doenças que são causadas por pragas da ordem Lepidoptera.

Ensaaios que medem o controle de uma praga são comumente conhecidos na arte, como os métodos para quantificar a resistência a doenças em plantas após a infecção do patógeno. Veja, por exemplo, Patente US No. 5.614.395, aqui incorporada por referência. Tais técnicas incluem medir por mais tempo o diâmetro médio da lesão, a biomassa do patógeno, bem como o percentual global de tecidos vegetais deteriorados. Veja, por exemplo, Thomma et al. (1998) *Plant Biology* 95:15107-15111, aqui incorporado por referência. Ver também os exemplos abaixo.

A invenção é designada para composições e métodos para proteger as plantas de uma praga vegetal, tais como as pragas da ordem Lepidoptera ou induzir resistência em uma planta a uma praga de planta, tais como as pragas da ordem Lepidoptera. Lagartas e as formas relacionadas de insetos lepidópteros constituem um importante grupo de pragas agrícolas comedoras de plantas, especialmente durante a fase de crescimento de larvas. Métodos de alimentação de larvas de Lepidoptera tipicamente incluem plantas de mascar ou partes de plantas. Como usado aqui, o termo "Lepidoptera" é usado para se referir a qualquer membro da ordem Lepidoptera. Em concretizações particulares, composições e métodos da invenção de controle de larvas de Lepidoptera (i.e. lagartas). Assim, as composições e métodos também são úteis para proteger as plantas contra qualquer

Lepidoptera, incluindo, por exemplo, *Pieris rapae*, *Pectinophora gossypiella*, *Synanthedon exitiosa*, *Melittia cucurbitae*, *Cydia pomonella*, *Grapholita molesta*, *Ostrinia nubilalis*, *Plodia interpunctella*, *Galleria mellonella*, *Manduca sexta*, *Manduca*
 5 *quinquemaculata*, *Lymantria dispar*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Trichoplusia ni*, *Mamestra brassicae*, *Agrotis ipsilon*, *Plutella xylostella*, *Anticarsia gemmatilis*, *Psuedoplusia includens*, *Epinotia aporema*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Heliothis armigera*, *Spodoptera exigua*, *Scirpophaga incertulus*,
 10 *Sesamia spp.*, *Buseola fusca*, *Cnaphalocrocis medinalis*, *Chilo suppressalis*, ou *Spodoptera littoralis*. Em concretizações particulares, métodos de controle de *Spodoptera frugiperda*.

II. Sequências alvo

15 Como usado aqui, uma "sequência-alvo" ou "polinucleotídeo alvo" compreende qualquer sequência na praga que se deseja reduzir o nível de expressão. Em concretizações específicas, diminuindo o nível da sequência alvo no controle de pragas da praga. Por exemplo, a sequência alvo pode ser essencial para o
 20 crescimento e desenvolvimento. Embora a sequência do alvo possa ser expressa em qualquer tecido da praga, em concretizações específicas da invenção, as sequências alvo para repressão em pragas são expressas em células do tecido de vísceras da praga, células do intestino das pragas, e células que revestem o lúmen
 25 intestinal ou o intestino. Sequências alvo deste tipo podem estar envolvidas no metabolismo, crescimento ou diferenciação da célula intestinal.

Em uma concretização da invenção a sequência alvo é composta por um polipeptídeo pertencente a uma ou mais classes
 30 de enzimas, como um polipeptídeo do hormônio juvenil, um polipeptídeo vacuolar, um polipeptídeo caderina, um

polipeptídeo de cutícula, um fator de iniciação de tradução, um polipeptídeo SAR1, um fator de alongamento, um fosfoligosacarídeo, um polipeptídeo miosina, um transportador de aminoácidos do canal de potássio, um retificador de potássio internamente, um transportador de aminoácidos, um polipeptídeo tubulina, um polipeptídeo ubiquitina, e uma ribonucleoproteína nuclear pequena.

Exemplos não limitantes de sequências alvo da invenção incluem um polinucleotídeo estabelecido na SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50. Como exemplificado aqui, diminuindo o nível de expressão dessas sequências alvo ou membros das classes de enzimas citadas em *Lepidoptera* controla a praga.

III. Elementos de Silenciamento

Por "elemento de silenciamento" entende-se um polinucleotídeo que, quando ingerido por uma praga, é capaz de eliminar ou reduzir o nível ou a expressão de um polinucleotídeo alvo ou do polipeptídeo codificado assim. O elemento de silenciamento empregado pode reduzir ou eliminar o nível de expressão da sequência alvo pela influência do nível do RNA alvo transcrito ou, alternativamente, pela influência de tradução, afetando assim o nível do polipeptídeo codificado. Métodos de ensaio para elementos de silenciamento funcionais que são capazes de eliminar ou reduzir o nível de uma sequência de interesse são divulgados no presente documento. Um polinucleotídeo único empregado nos métodos da invenção pode compreender um ou mais elementos de silenciamento para os mesmos ou diferentes polinucleotídeos alvo.

Em concretizações específicas, a sequência alvo não é um gene endógeno vegetal. Em outras concretizações, enquanto os elementos de silenciamento controlam pragas, de preferência, o elemento de silenciamento não tem efeito sobre a planta normal ou parte da planta.

Como discutido em detalhe mais adiante, elementos de silenciamento podem incluir, mas não estão limitados a, um elemento de supressão senso, um elemento de supressão antisense, uma fita dupla de RNA, um miRNA, ou um elemento de supressão de grampo. Exemplos não limitantes de elementos de silenciamento que podem ser empregados para diminuir a expressão dessas sequências alvo de Lepidoptera compreendem fragmentos e variantes de sequência senso ou antisense ou consistem de sequência senso ou antisense estabelecida SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 108, 111, 114, 117, 120, 123, 126, 129, 132, 135, 138, 141, 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 198, 201, 204, 207, 210, 213, 216, 219, 222, 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, 249, 252, 255, 258, 261, 264, 267, 270, 273, 276, 279, 282, 285, 288, 291, 294, 297, 300, 303, 306, 309, 312, 315, 318, 321, 324, 327, 330, 333, 336, 339, 342, 345, 348, 351, 354, 357, 360, 363, 366, 369, 372, 375, 378, 381, 384, 387, 390, 393, 396, 399, 402, 405, 408, 411, 415, 418, 421, 424, 427, 430, 433, 436, 439, 442, 457, 460, e/ou 463 ou uma variante biologicamente ativa ou fragmento da mesma. Em concretizações específicas, o elemento de silenciamento compreende ou consiste de pelo menos uma das sequências

definidas em qualquer uma das SEQ ID NOS: 51-465. Em outras concretizações, os elementos de silenciamento podem incluir, pelo menos, um resíduo de timina na extremidade 3'. Isto pode ajudar na estabilização. Assim, os elementos de silenciamento podem ter pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais resíduos de timina na extremidade 3'.

Em outras concretizações, o elemento de silenciamento compreende SEQ ID NO: 52 e 53, 55 e 56, 58 e 59, 61 e 62, 64 e 65, 67 e 68, 70 e 71, 73 e 74, 76 e 77, 79 e 80, 82 e 83, 85 e 86, 88 e 89, 91 e 92, 94 e 95, 97 e 98, 100 e 101, 103 e 104, 106 e 107, 109 e 110, 112 e 113, 115 e 116; 118 e 119, 121 e 122, 124 e 125, 127 e 128, 130 e 131, 133 e 134, 136 e 137, 139 e 140, 142 e 143, 145 e 146, 148 e 149, 151 e 152, 154 e 155, 157 e 158, 160 e 161, 163 e 164, 166 e 167, 169 e 170, 172 e 173, 175 e 176, 178 e 179, 181 e 182, 184 e 185, 187 e 188, 190 e 191; 193 e 194, 196 e 197, 199 e 200, 202 e 203, 205 e 206, 208 e 209, 211 e 212, 214 e 215, 217 e 218, 220 e 221, 223 e 224, 226 e 227, 229 e 230, 232 e 233, 235 e 236, 238 e 239, 241 e 242, 244 e 245, 247 e 248, 250 e 251, 253 e 254, 256 e 257, 259 e 260, 262 e 263, 265 e 266; 268 e 269, 271 e 272, 274 e 275, 277 e 278, 280 e 281, 283 e 284, 286 e 287, 289 e 290, 292 e 293, 295 e 296, 298 e 299, 301 e 302, 304 e 305, 307 e 308, 310 e 311, 313 e 314, 316 e 317, 319 e 320, 322 e 323, 325 e 326, 328 e 329, 331 e 332, 334 e 335, 337 e 338, 340 e 341; 343 e 344, 346 e 347, 349 e 350, 352 e 353, 355 e 356, 358 e 359, 361 e 362, 364 e 365, 367 e 368, 370 e 371, 373 e 374, 376 e 377, 379 e 380, 382 e 383, 385 e 386, 388 e 389, 391 e 392, 394 e 395, 397 e 398, 400 e 401, 403 e 404, 406 e 407, 409 e 410, 412 e 413, 416 e 417; 419 e 420, 422 e 423, 425 e 426, 428 e 429, 431 e 432, 434 e 435, 437 e 438, 440 e 441, 443 e 444, 458 e 459, 461 e 462, e/ou 464 e 465.

Por "redução" ou "reduzir" o nível de expressão de um polinucleotídeo ou um polipeptídeo codificado, assim, entende-se como significado que, o nível de polinucleotídeo ou polipeptídeo da sequência alvo é significativamente menor do que o nível de polinucleotídeo ou nível do polipeptídeo da mesma sequência alvo em uma praga controle adequada que não seja exposta ao (ou seja, não tenha ingerido), elemento de silenciamento. Em concretizações particulares da invenção, reduzindo o nível de polinucleotídeo e/ou o nível de polipeptídeo da sequência alvo em uma praga de acordo com a invenção resulta em menos de 95%, menos de 90%, menos de 80%, menos de 70%, menos de 60%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 10%, ou menos de 5% do nível de polinucleotídeo, ou do nível do polipeptídeo assim codificado, da mesma sequência alvo em uma praga controle adequada. Métodos de ensaio para o nível da transcrição do RNA, o nível do polipeptídeo codificado, ou a atividade do polinucleotídeo ou polipeptídeo são discutidos em outro lugar deste documento.

20 *i. Elementos de Supressão Senso*

Como usado aqui, um "elemento de supressão senso" compreende um polinucleotídeo projetado para expressar uma molécula de RNA correspondente a pelo menos uma parte de um RNA mensageiro alvo, em uma orientação "senso". Expressão da molécula de RNA compreendendo o elemento de supressão senso reduz ou elimina o nível do polinucleotídeo-alvo ou do polipeptídeo assim codificado. O polinucleotídeo compreendendo o elemento de supressão senso pode corresponder à totalidade ou parte da sequência do polinucleotídeo-alvo, a totalidade ou parte da região não traduzida 5' e/ou 3' do polinucleotídeo alvo, a totalidade ou parte da sequência de codificação do

polinucleotídeo-alvo, ou a totalidade ou parte de ambas as sequências de codificação e as regiões não traduzidas do polinucleotídeo alvo.

5 Normalmente, um elemento de supressão senso tem identidade de sequência substancial para o polinucleotídeo-alvo, normalmente superior a cerca de 65% de identidade de sequência, maior do que cerca de 85% de identidade de sequência, cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência. Veja, Patentes US nos. 5.283.184 e
10 5.034.323; aqui incorporadas por referência. O elemento de supressão senso pode ser de qualquer tamanho, desde que permita a supressão da sequência alvo. O elemento de supressão senso pode ser, por exemplo, 15, 20, 22, 25, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 900 ou maior.

15

ii. Elementos de Supressão Anti-Senso

Como usado aqui, um "elemento de supressão antisenso" compreende um polinucleotídeo que visa expressar uma molécula de RNA complementar a totalidade ou parte de um RNA mensageiro
20 alvo. Expressão do elemento de supressão de RNA antisenso reduz ou elimina o nível de polinucleotídeo alvo. O polinucleotídeo para uso na supressão antisenso pode corresponder a totalidade ou parte do complemento da sequência de codificação do polinucleotídeo-alvo, a totalidade ou parte do complemento da
25 região não traduzida 5' e/ou 3' do polinucleotídeo-alvo, a totalidade ou parte do complemento da sequência de codificação do polinucleotídeo-alvo, ou a totalidade ou parte do complemento de ambas as sequência de codificação e as regiões não traduzidas do polinucleotídeo alvo. Além disso, o elemento
30 de supressão antisenso pode ser totalmente complementar (ou seja, 100% idêntico ao complemento da sequência alvo) ou

parcialmente complementar (isto é, menos de 100% idêntico ao complemento da sequência alvo) ao polinucleotídeo-alvo. Em concretizações específicas, o elemento de supressão antisense compreende pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de complementaridade de sequência ao polinucleotídeo alvo. Supressão antisense pode ser utilizada para inibir a expressão de múltiplas proteínas na mesma planta. Veja, por exemplo, Patente US No. 5.942.657. Além disso, o elemento de supressão antisense pode ser complementar a uma porção do polinucleotídeo alvo. Geralmente, sequências de pelo menos 15, 20, 22, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 450 nucleotídeos ou mais podem ser utilizadas. Métodos para usar a supressão antisense para inibir a expressão de genes endógenos em plantas são descritos, por exemplo, em Liu et al (2002) *Plant Physiol* 129:1732-1743 e Patentes US N° s 5.759.829 e 5.942.657, cada um dos quais é aqui incorporado por referência.

iii. Elemento de Supressão de RNA de dupla fita

Um "elemento de silenciamento de RNA de dupla fita" ou "dsRNA" inclui pelo menos um transcrito que é capaz de formar um dsRNA antes ou após a ingestão pela praga. Assim, um "elemento de silenciamento de dsRNA" inclui um dsRNA, um transcrito ou polirribonucleotídeo capaz de formar um dsRNA ou mais de um transcrito ou polirribonucleotídeo capaz de formar um dsRNA. "RNA de dupla fita", ou "dsRNA" refere-se a uma estrutura de polirribonucleotídeo formada por uma única molécula de RNA complementar a ela mesma ou uma estrutura de polirribonucleotídeo formada pela expressão de pelo menos duas fitas distintas de RNA. A(s) molécula(s) de dsRNA empregada(s) nos métodos e composições da invenção media a redução da expressão de uma sequência alvo, por exemplo, mediando "RNAi"

de interferência de RNA ou silenciamento gênico em um modo específico de sequência . No contexto da presente invenção, o dsRNA é capaz de eliminar ou reduzir o nível ou a expressão de um polinucleotídeo alvo ou do polipeptídeo assim codificado em uma praga.

O dsRNA pode reduzir ou eliminar o nível de expressão da sequência alvo, influenciando o nível de transcrição do RNA-alvo, influenciando a tradução, e afetando assim o nível do polipeptídeo codificado, ou influenciando a expressão do nível pré-transcricional (i.e., através da modulação da estrutura da cromatina, padrão de metilação, etc, para alterar a expressão de genes). Veja, por exemplo, Verdel et al. (2004) *Science* 303:672-676; Pal-Bhadra et al. (2004) *Science* 303:669 -672; Allshire (2002) *Science* 297:1818-1819; Volpe et al. (2002) *Science* 297:1833-1837; Jenuwein (2002), *Science* 297:2215-2218 e Hall et al. (2002), *Science* 297: 2232-2237. Métodos de ensaio para iRNA funcional que são capazes de eliminar ou reduzir o nível de uma sequência de interesse são divulgados em outros lugares deste documento. Assim, como aqui utilizado, o termo "dsRNA" se destina a abranger outros termos usados para descrever moléculas de ácidos nucleicos que são capazes de mediar a interferência de RNA ou silenciamento de genes, incluindo, por exemplo, RNA de interferência curta (siRNA), RNA de dupla fita (dsRNA), micro-RNA (miRNA), RNA grampo, RNA grampo curto (shRNA), RNA de silenciamento de gene pós-transcricional (ptgsRNA), e outros.

Em concretizações específicas, pelo menos, uma fita do duplex ou região de dupla fita do dsRNA mostra identidade de sequência ou complementaridade de sequência suficiente com o polinucleotídeo alvo para permitir o dsRNA reduzir o nível de expressão da sequência alvo. Como usado aqui, a fita que é

complementar ao polinucleotídeo alvo é a "fita antisense" e a fita homóloga ao polinucleotídeo alvo é a "fita senso".

Em uma concretização, o dsRNA compreende um RNA grampo. Um RNA grampo é composto por uma molécula de RNA que é capaz de dobrar de volta para si para formar uma estrutura de cadeia dupla. Estruturas múltiplas podem ser utilizadas como elementos grampo. Em concretizações específicas, o elemento de supressão de dsRNA compreende um elemento grampo que inclui na seguinte ordem, um primeiro segmento, um segundo segmento, e um terceiro segmento, onde o primeiro e o terceiro segmento mostram complementaridade suficiente para permitir que o RNA transcrito forme uma estrutura de filamento haste-alça de dupla fita.

O "segundo segmento" do grampo compreende uma "alça" ou uma "região de alça". Esses termos são usados como sinônimos neste documento e devem ser interpretados amplamente para incluir qualquer sequência de nucleotídeos que confere flexibilidade suficiente para permitir o auto-emparelhamento para ocorrer entre regiões complementares de um polinucleotídeo (ou seja, segmentos 1 e 3 que formam a haste do grampo). Por exemplo, em algumas concretizações, a região de alça pode ser substancialmente de fita simples e age como um espaçador entre as regiões auto-complementares do grampo haste-alça. Em algumas concretizações, a região de alça pode incluir uma sequência de nucleotídeos não-senso ou aleatória e, portanto, não mostra identidade de sequência para um polinucleotídeo alvo. Em outras concretizações, a região de alça compreende uma sequência senso ou antisense de RNA ou seu fragmento que mostra identidade com um polinucleotídeo alvo. Ver, por exemplo, a Publicação International de Patente No. WO 02/00904, aqui incorporada por referência. Em concretizações específicas, a região de alça pode ser otimizada para ser tão curta quanto possível, enquanto

ainda fornece flexibilidade intramolecular suficiente para permitir a formação das regiões de haste de bases pareadas. Assim, a sequência de alça é geralmente inferior a 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 25, 20, 15, 10
5 nucleotídeos ou menos.

O "primeiro" e o "terceiro" segmento da molécula de RNA grampo compõem a haste pareada da estrutura de grampo. O primeiro e o terceiro segmentos são repetições invertidas um do outro e compartilham complementaridade suficiente para permitir
10 a formação da região de haste de bases pareadas. Em concretizações específicas, o primeiro e o terceiro segmentos são totalmente complementares um ao outro. Alternativamente, o primeiro e o terceiro segmentos podem ser parcialmente complementares uns aos outros, enquanto eles são capazes de
15 hibridização entre si para formar uma região de haste de bases pareadas. A quantidade de complementaridade entre o primeiro e o terceiro segmentos pode ser calculada como uma porcentagem do segmento inteiro. Assim, o primeiro e o terceiro segmentos do RNA grampo geralmente compartilham pelo menos 50%, 60%, 70%,
20 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, até e inclusive 100% de complementaridade.

O primeiro e o terceiro segmentos tem, pelo menos, cerca de 1000, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 25, 22, 20, 15 ou 10 nucleotídeos de comprimento. Em concretizações específicas,
25 o comprimento do primeiro e/ou do terceiro segmento é de cerca de 10-100 nucleotídeos, cerca de 10 a cerca de 75 nucleotídeos, cerca de 10 a cerca de 50 nucleotídeos, cerca de 10 a cerca de 40 nucleotídeos, cerca de 10 a cerca de 35 nucleotídeos, cerca de 10 a cerca de 30 nucleotídeos, cerca de 10 a cerca de 25
30 nucleotídeos, cerca de 10 a cerca de 20 nucleotídeos. Em outras concretizações, o comprimento do primeiro e/ou do terceiro

segmento é composto por pelo menos 10-20 nucleotídeos, 20-35 nucleotídeos, 30-45 nucleotídeos, 40-50 nucleotídeos, 50-100 nucleotídeos, ou 100-300 nucleotídeos. Ver, por exemplo, a Publicação International No. WO 0200904. Em concretizações específicas, o primeiro e o terceiro segmento compreendem pelo menos 20 nucleotídeos tendo pelo menos 85% de complementariedade ao primeiro segmento. Ainda em outras concretizações, o primeiro e o terceiro segmentos que formam a estrutura haste-alça do grampo compreendem regiões 3' ou 5' salientadas tendo resíduos de nucleotídeos pareados.

Em concretizações específicas, as sequências utilizadas no primeiro, no segundo e/ou no terceiro segmentos compreendem domínios que são projetados para ter uma identidade de sequência suficiente para um polinucleotídeo alvo de interesse e assim ter a capacidade de diminuir o nível de expressão do polinucleotídeo alvo. A especificidade dos transcritos de RNA inibidores é, portanto, conferida geralmente por esses domínios do elemento de silenciamento. Assim, em algumas concretizações da invenção, o primeiro, segundo e/ou terceiro segmentos do elemento de silenciamento compreendem um domínio de pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 19, pelo menos 20, pelo menos 21, pelo menos 22, pelo menos 23, pelo menos 24, pelo menos 25, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 100, pelo menos 200, pelo menos 300, pelo menos 500, pelo menos 1000, ou mais de 1000 nucleotídeos que compartilham identidade de sequência suficiente para o polinucleotídeo alvo para permitir uma diminuição nos níveis de expressão do polinucleotídeo alvo quando expresso em uma célula apropriada. Em outras concretizações, o domínio é entre cerca de 15 a 50 nucleotídeos, cerca de 20-35 nucleotídeos, cerca de 25-50

nucleotídeos, cerca de 20 a 75 nucleotídeos, cerca de 40-90 nucleotídeos cerca de 15-100 nucleotídeos.

Em concretizações específicas, o domínio do primeiro, do segundo e/ou do terceiro segmento tem 100% de identidade de sequência para o polinucleotídeo alvo. Em outras concretizações, o domínio do primeiro, segundo e/ou terceiro segmento tendo homologia com o polipeptídeo alvo de, pelo menos, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% , de identidade de sequência com uma região do polinucleotídeo alvo. A identidade de sequência dos domínios do primeiro, segundo e/ou terceiro segmentos do polinucleotídeo alvo apenas necessita ser suficiente para diminuir a expressão do polinucleotídeo alvo de interesse. Ver, por exemplo, Chuang e Meyerowitz (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4985-4990; Stoutjesdijk et al. (2002) *Plant Physiol.* 129:1723-1731; Waterhouse e Helliwell (2003) *Nat. Rev. Genet.* 4:29-38; Pandolfini et al. *BMC Biotechnology* 3:7, e Publicação de Patente US No. 20030175965, cada um dos quais é aqui incorporado por referência. Um ensaio transiente para a eficiência de construções de hpRNA para expressão de gene de silenciamento in vivo tem sido descrito por Panstruga et al. (2003) *Mol. Biol. Rep.* 30:135-140, aqui incorporado por referência.

A quantidade de complementaridade compartilhada entre o primeiro, segundo e/ou terceiro segmento e o polinucleotídeo-alvo ou a quantidade de complementaridade partilhada entre o primeiro segmento e o terceiro segmento (isto é, a haste da estrutura de grampo) pode variar dependendo do organismo em que a expressão do gene é controlada. Alguns tipos de células ou organismos podem exigir o emparelhamento exato ou identidade de 100%, enquanto que outros organismos ou tipos de células podem

tolerar algumas inadequações. Em algumas células, por exemplo, uma incompatibilidade de um único nucleotídeo na sequência alvo revoga a capacidade de suprimir a expressão gênica. Nessas células, os cassetes de supressão da invenção podem ser usados para objetivar a supressão de genes mutantes, por exemplo, oncogenes cujos transcritos incluem mutações pontuais e, portanto, podem ser direcionados especificamente com os métodos e composições da invenção sem alterar a expressão do alvo tipo selvagem restante.

10 Qualquer região do polinucleotídeo alvo pode ser usada para projetar o domínio do elemento de silenciamento que mostra identidade de sequência suficiente para permitir a expressão do transcrito grampo para diminuir o nível de polinucleotídeo alvo. Por exemplo, o domínio pode ser projetado para mostrar

15 identidade de sequência com a região não traduzida 5' do polinucleotídeo(s)-alvo, a região não traduzida 3' do polinucleotídeo(s)-alvo, regiões exônicas do polinucleotídeo(s)-alvo, regiões intrônicas do polinucleotídeo(s)-alvo, e qualquer combinação dos mesmos. Em

20 concretizações específicas, um domínio do elemento de silenciamento mostra homologia suficiente para, pelo menos, cerca de 15, 20, 22, 25 ou 30 nucleotídeos consecutivos a partir de cerca de nucleotídeos 10-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 550-

25 600, 600-650, 650-700, 750-800, 850-900, 950-1000, 1000-1050, 1050-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400, 1400-1500, 1500-1600, 1600-1700, 1700-1800, 1800-1900, 1900-2000 da sequência alvo. Em alguns casos, para otimizar sequências de siRNA empregadas no grampo, o método H de oligodeoxirribonucleotídeo

30 sintético/RNase pode ser usado para determinar sítios no mRNA alvo que estão em uma conformação que é suscetível ao

silenciamento de RNA. Ver, por exemplo, Vickers et al. (2003) *J. Biol. Chem* 278:7108-7118 e Yang et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9442-9447, aqui incorporados por referência. Esses estudos indicam que existe uma correlação significativa entre os sítios H-sensíveis ao RNase e sítios que promovem
5 degradação de mRNA siRNA-dirigido eficiente.

O elemento de silenciamento de grampo também pode ser concebido de modo que a sequência senso ou a sequência antisenso não correspondem a um polinucleotídeo alvo. Nesta
10 concretização, a sequência senso e antisenso flanqueiam uma sequência de alça que compreende uma sequência de nucleotídeos correspondente à totalidade ou parte do polinucleotídeo alvo. Assim, é a região de alça que determina a especificidade da interferência do RNA. Veja, por exemplo, WO 02/00904, aqui
15 incorporado por referência.

Em concretizações específicas, o elemento de silenciamento compreendendo o grampo compreende sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID NO: 52 e 53, 55 e 56, 58 e 59, 61 e 62, 64 e 65, 67 e 68, 70 e 71; 73 e 74, 76 e 77, 79 e 80, 82 e
20 83, 85 e 86, 88 e 89, 91 e 92, 94 e 95, 97 e 98, 100 e 101, 103 e 104, 106 e 107, 109 e 110, 112 e 113, 115 e 116, 118 e 119, 121 e 122, 124 e 125, 127 e 128, 130 e 131, 133 e 134, 136 e 137, 139 e 140, 142 e 143, 145 e 146; 148 e 149, 151 e 152, 154 e 155, 157 e 158, 160 e 161, 163 e 164, 166 e 167, 169 e 170,
25 172 e 173, 175 e 176, 178 e 179, 181 e 182, 184 e 185, 187 e 188, 190 e 191, 193 e 194, 196 e 197, 199 e 200, 202 e 203, 205 e 206, 208 e 209, 211 e 212, 214 e 215, 217 e 218, 220 e 221; 223 e 224, 226 e 227, 229 e 230, 232 e 233, 235 e 236, 238 e 239, 241 e 242, 244 e 245, 247 e 248, 250 e 251, 253 e 254, 256
30 e 257, 259 e 260, 262 e 263, 265 e 266, 268 e 269, 271 e 272, 274 e 275, 277 e 278, 280 e 281, 283 e 284, 286 e 287, 289 e

290, 292 e 293, 295 e 296; 298 e 299, 301 e 302, 304 e 305, 307 e 308, 310 e 311, 313 e 314, 316 e 317, 139 e 320, 322 e 323, 325 e 326, 328 e 329, 331 e 332, 334 e 335, 337 e 338, 340 e 341, 343 e 344, 346 e 347, 349 e 350, 352 e 353, 355 e 356, 358 e 359, 361 e 362, 364 e 365, 367 e 368, 370 e 371; 373 e 374, 376 e 377, 379 e 380, 382 e 383, 385 e 386, 388 e 389, 391 e 392, 394 e 395, 397 e 398, 400 e 401, 403 e 404, 406 e 407, 409 e 410, 412 e 413, 416 e 417, 419 e 420, 422 e 423, 425 e 426, 428 e 429, 431 e 432, 434 e 435, 437 e 438, 440 e 441, 443 e 444, 458 e 459; 461 e 462, e/ou 464 e 465.

Além disso, silenciamento do gene transcricional (TGS) pode ser obtido através da utilização de um elemento de supressão de grampo, onde a repetição invertida do grampo mostra identidade de sequência com a região promotora de um polinucleotídeo alvo a ser silenciado. Veja, por exemplo, Aufsatz et al. (2002), *PNAS* 99 (Supl. 4): 16499-16506 e Mette et al. (2000) *EMBO J* 19 (19): 5194-5201.

Em outras concretizações, o dsRNA pode incluir um pequeno RNA (srRNA). SRNAs podem incluir tanto RNA micro (miRNA) e RNA de interferência curta (siRNA) (Meister e Tuschl (2004) *Nature* 431:343-349 e Bonetta et al. (2004) *Nature Methods* 1:79-86). miRNAs são agentes de regulação compreendendo cerca de 19 ribonucleotídeos que são altamente eficazes na inibição da expressão de polinucleotídeos alvo. Ver, por exemplo, Javier et al. (2003) *Nature* 425: 257-263, aqui incorporado por referência. Para interferência de miRNA, o elemento de silenciamento pode ser projetado para expressar uma molécula de dsRNA que forma uma estrutura de grampo contendo uma sequência de 19 nucleotídeos que é complementar ao polinucleotídeo alvo de interesse. O miRNA pode ser feito de forma sintética, ou transcrito como um RNA mais longo que é posteriormente clivado

para produzir o miRNA ativo. Especificamente, o miRNA pode incluir 19 nucleotídeos da sequência com homologia a um polinucleotídeo-alvo, na orientação senso e 19 nucleotídeos de uma sequência antisenso correspondente, que é complementar à sequência senso.

Ao expressar um miRNA, reconhece-se que várias formas de um miRNA podem ser transcritas, incluindo, por exemplo, o transcrito primário (chamado de "pri-miRNA"), que é processado através de várias etapas nucleolíticas a um precursor menor de miRNA (denominado "pré-miRNA"), o pré-miRNA, ou o miRNA final (maduro) está presente em um duplex, as duas fitas sendo referidas como o miRNA (a fita que irá eventualmente parear a base com o alvo) e miRNA*. O pre-miRNA é um substrato para uma forma de dicer que remove o miRNA/miRNA* duplex a partir do precursor, após o que, à semelhança dos siRNAs, o duplex pode ser levado ao complexo RISC. Demonstrou-se que os miRNAs podem ser expressos transgenicamente e são eficazes através da expressão de uma forma precursora, ao invés da forma primária inteira (Parizotto et al. (2004) *Genes & Development* 18 :2237-2242 e Guo et al. (2005) *Plant Cell* 17:1376-1386).

Os métodos e composições da invenção empregam elementos de silenciamento que quando transcritos "formam" uma molécula de dsRNA. Assim, o polinucleotídeo heteróloga sendo expresso não precisa formar o dsRNA por si só, mas pode interagir com outras sequências na célula vegetal ou no intestino de pragas após a ingestão para permitir a formação do dsRNA. Por exemplo, um polinucleotídeo quimérico que pode seletivamente silenciar o polinucleotídeo alvo pode ser gerado por expressar uma construção quimérica que compreende a sequência alvo para miRNA ou siRNA a uma sequência correspondente à totalidade ou parte do gene ou genes a serem silenciados. Nesta concretização, o

dsRNA é "formado", quando o alvo para o miRNA ou siRNA interage com o miRNA presente na célula. O dsRNA resultante pode então reduzir o nível de expressão do gene ou genes a serem silenciados. Veja, por exemplo, Pedido provisório US nº 60/691,613, depositado em 17 de junho de 2005, intitulada "Métodos e composições para Silenciamento de Gene", aqui incorporada por referência. A construção pode ser projetada para ter um alvo para um miRNA endógeno ou, alternativamente, um alvo para um miRNA heterólogo e/ou sintético pode ser empregado na construção. Se um miRNA heterólogo e/ou sintético é empregado, ele pode ser introduzido na célula na mesma construção de nucleotídeo como o polinucleotídeo quimérico ou em uma construção separada. Conforme já discutido aqui, qualquer método pode ser usado para introduzir a construção compreendendo o miRNA heterólogo.

IV. Variantes e Fragmentos

Por "fragmento" entende-se uma porção do polinucleotídeo ou uma porção da sequência de aminoácidos e, conseqüentemente, a proteína codificada por ela. Fragmentos de um polinucleotídeo podem codificar fragmentos de proteínas que mantêm a atividade biológica da proteína nativa. Alternativamente, os fragmentos de um polinucleotídeo que são úteis como elementos de silenciamento não precisam codificar fragmentos de proteínas que retem atividade biológica. Assim, fragmentos de uma sequência de nucleotídeos podem variar de pelo menos cerca de 10, cerca de 15, cerca de 20 nucleotídeos, cerca de 22 nucleotídeos, cerca de 50 nucleotídeos, cerca de 75 nucleotídeos, cerca de 100 nucleotídeos, 200 nucleotídeos, 300 nucleotídeos, 400 nucleotídeos, 500 nucleotídeos, 600 nucleotídeos, 700 nucleotídeos e até mais polinucleotídeos de

comprimento total empregados na invenção. Métodos de ensaio para a atividade de um elemento de silenciamento desejado ou um elemento potenciador supressor são descritos no presente documento.

5 Por "variantes" entende-se a média de sequências substancialmente similares. Para polinucleotídeos, uma variante compreende uma deleção e/ou adição de um ou mais nucleotídeos em um ou mais sítios internos dentro do polinucleotídeo nativo e/ou substituição de um ou mais nucleotídeos em um ou mais
10 sítios no polinucleotídeo nativo. Tal como aqui utilizado, um polinucleotídeo "nativo" ou polipeptídeo compreende uma sequência de nucleotídeos que ocorre naturalmente ou sequência de aminoácidos, respectivamente. Para polinucleotídeos, variantes conservadoras incluem aquelas sequências que, devido
15 à degeneração do código genético, codificam a sequência de aminoácidos de um dos polipeptídeos empregados na invenção. Polinucleotídeos variantes também incluem derivados de polinucleotídeo sinteticamente, como os gerados, por exemplo, usando mutagênese sítio-dirigida, mas continuam a manter a
20 atividade desejada. Geralmente, variantes de um polinucleotídeo particular da invenção (ou seja, um elemento de silenciamento) terão pelo menos cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para que um
25 polinucleotídeo particular, como determinado por programas de alinhamento de sequência e parâmetros descritos no presente documento.

Variantes de um polinucleotídeo particular da invenção (i.e., o polinucleotídeo de referência) também podem ser
30 avaliadas através da comparação do percentual de identidade de sequência entre o polipeptídeo codificado por um

polinucleotídeo variante e o polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo de referência. Percentual de identidade de sequência entre quaisquer dois polipeptídeos pode ser calculado usando programas de alinhamento de sequência e parâmetros descritos no presente documento. Quando um determinado par de polinucleotídeos empregados na invenção é avaliado através da comparação do percentual da identidade de sequência compartilhada 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%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de sequência de identidade.

Proteína "variante" destina-se a significar uma proteína derivada da proteína nativa pela supressão ou adição de um ou mais aminoácidos em um ou mais sítios internos na proteína nativa e/ou substituição de um ou mais aminoácidos em um ou mais sítios na proteína nativa. Proteínas variantes abrangidas pela presente invenção são biologicamente ativas, isto é, elas continuam a possuir a atividade biológica desejada da proteína nativa, como discutido em outro lugar aqui. Tais variações podem resultar, por exemplo, do polimorfismo genético ou de manipulação humana. Variantes biologicamente ativas de uma proteína nativa terão pelo menos cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos para a proteína nativa, como determinado pelos programas de alinhamento de sequência e parâmetros descritos no presente documento. Uma variante biologicamente ativa de uma proteína da invenção pode ser diferente da proteína por somente 1-15 resíduos de aminoácidos,

somente 1-10, tais como 6-10, somente 5, somente 4, 3, 2 , ou mesmo 1 resíduo de aminoácido.

Os seguintes termos são usados para descrever as relações de sequência entre dois ou mais polinucleotídeos e polipeptídeos: (a) "sequência de referência", (b) "janela de
5 comparação", (c) "identidade de sequência" e (d) "percentual de identidade de sequência".

- 10 (a) Como usado aqui, "sequência de referência" é uma sequência definida utilizada como base para comparação de sequência. Uma sequência de referência pode ser um subconjunto ou a totalidade de uma sequência específica, por exemplo, como um segmento de cDNA de comprimento total ou sequência do gene, ou o cDNA completo ou sequência do gene.
- 15 (b) Como usado aqui, uma "janela de comparação" faz referência a um segmento determinado e contíguo de uma sequência de polinucleotídeo, onde a sequência de polinucleotídeo na janela de comparação pode incluir acréscimos ou supressões (ou seja,
20 lacunas) em relação à sequência de referência (que não inclui acréscimos ou supressões) para o alinhamento ideal dos dois polinucleotídeos. Geralmente, a janela de comparação é de pelo menos 20 nucleotídeos contíguos de comprimento e,
25 opcionalmente, pode ser de 30, 40, 50, 100, ou mais. Aqueles versados na técnica entendem que, para evitar uma alta similaridade de uma sequência de referência, devido à inclusão das lacunas na sequência de polinucleotídeo uma lacuna é
30 normalmente introduzida e é subtraída do número de combinações.

Salvo disposição em contrário, valores de identidade de sequência/similaridade aqui fornecidos referem-se ao valor obtido com GAP versão 10 usando os seguintes parâmetros: % de identidade e % de similaridade para uma sequência de nucleotídeos utilizando peso de GAP de 50 e Peso de Comprimento de 3, e a matriz de pontuação nwsgapdna.cmp; % de identidade e % de semelhança para uma sequência de aminoácidos com peso de GAP de 8 e Peso de Comprimento de 2, e a matriz de pontuação BLOSUM62, ou qualquer outro programa equivalente. Por "programa equivalente" entende-se qualquer programa de comparação de sequências que, para quaisquer duas sequências em questão, gera um alinhamento tendo nucleotídeos idênticos ou combinações de resíduos de aminoácido encontradas e um percentual de identidade de sequência idêntico, quando comparado com o alinhamento correspondente gerado por GAP versão 10.

(c) Quando usados neste documento, "identidade de sequência" ou "identidade" no contexto de duas sequências de polipeptídeos ou polinucleotídeos fazem referência aos resíduos nas duas sequências que são os mesmos quando alinhados para correspondência máxima sobre uma janela de comparação especificada. Quando o percentual de identidade de sequência é usado em referência às proteínas, é reconhecido que as posições de resíduos que não são idênticas, muitas vezes diferem pelas substituições de aminoácidos conservadoras, onde os resíduos de aminoácidos são substituídos por outros resíduos de aminoácidos com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade) e, portanto, não alteram as propriedades funcionais da molécula. Quando as

sequências diferem em substituições conservadoras, o percentual de identidade de sequência pode ser ajustado para corrigir a natureza conservadora da substituição. Sequências que diferem por tais substituições conservadoras são ditas como tendo "similaridade de sequência" ou "similaridade". Meios para fazer este ajuste são bem conhecidos para os técnicos na arte. Normalmente, isso envolve marcar uma substituição conservadora como parcial, em vez de uma incompatibilidade total, aumentando assim o percentual de identidade de sequência. Assim, por exemplo, onde a um aminoácido idêntico é dada uma pontuação de 1 e a uma substituição não conservadora é dada uma pontuação de zero, a uma substituição conservadora é atribuída uma pontuação entre zero e 1. A pontuação das substituições conservadoras é calculada, por exemplo, tal como aplicada no programa PC/GENE (IntelliGenetics, Mountain View, Califórnia).

- (d) Como usado aqui, "percentagem de identidade de sequência" significa o valor determinado pela comparação de duas sequências alinhadas de forma ótima em uma janela de comparação, onde a porção da sequência de polinucleotídeo na janela de comparação pode incluir acréscimos ou supressões (ou seja, lacunas) em comparação com a sequência de referência (que não inclui acréscimos ou supressões) para o alinhamento ideal das duas sequências. O percentual é calculado através da determinação do número de posições em que o ácido

5 nucleico base idêntico ou resíduo de aminoácido
 ocorre em ambas as sequências para gerar o número
 de posições correspondentes, dividindo o número de
 posições correspondentes pelo número total de
 posições na janela de comparação e multiplicando o
 resultado por 100 para produzir o percentual de
 identidade de sequência.

V. Construções de DNA

10 O uso do termo "polinucleotídeo" não se destina a limitar
 a presente invenção de polinucleotídeos compreendendo DNA.
 Aqueles de habilidade ordinária na técnica reconhecem que
 polinucleotídeos podem incluir ribonucleotídeos e combinações
 de ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos. Tais
15 desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos incluem ambas
 moléculas de ocorrência natural e análogas sintéticas. Os
 polinucleotídeos da invenção também abrangem todas as formas de
 sequências, incluindo, mas não limitado a, formas de fita
 simples, formas de dupla fita, grampos, estruturas haste-e-alça
20 (stem-and-loop), e assim por diante.

 O polinucleotídeo codificando o elemento de silenciamento
 ou em concretizações específicas utilizadas nos métodos e
 composições da invenção pode ser fornecido em cassetes de
 expressão para expressão em uma planta ou organismo de
25 interesse. Reconhece-se que vários elementos, incluindo vários
 elementos de silenciamento idênticos, elementos de
 silenciamento múltiplos objetivando diferentes regiões da
 sequência alvo, ou elementos de silenciamento múltiplos para
 sequências-alvo diferentes podem ser usados. Nesta
30 concretização, é reconhecido que cada elemento de silenciamento
 pode estar contido em um cassete único ou separado, construção

de DNA, ou vetor. Como discutido qualquer meio para fornecer o elemento de silenciamento é contemplado. Uma planta ou célula vegetal pode ser transformada com um cassete único compreendendo DNA codificando um ou mais elementos de
5 silenciamento ou cassetes separados compreendendo cada elemento de silenciamento pode ser usado para transformar uma planta ou célula vegetal ou célula hospedeira. Da mesma forma, uma planta transformada com um componente pode ser posteriormente transformada com o segundo elemento. Um ou mais elementos de
10 silenciamento também podem ser reunidos através do cruzamento sexual. Ou seja, uma primeira planta compreendendo um componente é cruzada com uma segunda planta compreendendo o segundo componente. Plantas descendentes do cruzamento compreenderão ambos os componentes.

15 O cassete de expressão pode incluir sequências regulatórias 5' e 3' operacionalmente ligadas ao polinucleotídeo da invenção. "Operacionalmente ligado" é destinado a significar uma ligação funcional entre dois ou mais elementos. Por exemplo, uma ligação operacional entre um
20 polinucleotídeo da invenção e uma sequência regulatória (ou seja, um promotor) é uma ligação funcional que permite a expressão do polinucleotídeo da invenção. Elementos ligados operacionalmente podem ser contíguos ou não contíguos. Quando usado para se referir à união de duas regiões codificadoras de
25 proteínas, por operacionalmente ligado entende-se que as regiões codificadoras estão no mesmo quadro de leitura. O cassete pode ainda conter pelo menos um polinucleotídeo adicional a ser cotransformado no organismo. Alternativamente, o polipeptídeo(s) adicional pode ser fornecido em múltiplos
30 cassetes de expressão. Cassetes de expressão podem ser fornecidos com uma pluralidade de sítios de restrição e/ou

sítios de recombinação para inserção do polinucleotídeo a estar sob a regulação da transcrição das regiões reguladoras. O cassete de expressão pode ainda conter genes marcadores selecionáveis.

- 5 O cassete de expressão inclui na direção de transcrição 5'-3', uma região de iniciação de tradução e transcrição (ou seja, um promotor), um polinucleotídeo compreendendo o elemento de silenciamento empregado nos métodos e composições da invenção, e uma região de terminação de transcrição e tradução
- 10 (i.e., região de terminação) funcional em plantas. Regiões reguladoras (ie, promotores, regiões reguladoras da transcrição, e regiões de terminação traducional) e/ou polinucleotídeos empregados na invenção podem ser nativos/análogos à célula hospedeira ou a outras.
- 15 Alternativamente, as regiões reguladoras e/ou polinucleotídeos empregados na invenção podem ser heterólogos para a célula hospedeira ou uns aos outros. Como usado aqui, "heterólogas", em referência a uma sequência é uma sequência que se origina de uma espécie estrangeira, ou, se da mesma espécie, é
- 20 substancialmente modificada da sua forma nativa em composição e/ou locus do genoma por intervenção humana intencional. Por exemplo, um promotor operacionalmente ligado a um polinucleotídeo heterólogo é de uma espécie diferente da espécie da qual o polinucleotídeo foi derivado, ou, se da
- 25 mesma/ espécie análoga, um ou ambos são substancialmente modificados de sua forma original e/ou locus genômico, ou o promotor não é o promotor natural para o polinucleotídeo operacionalmente ligado. Como usado aqui, um gene quimérico compreende uma sequência de codificação operacionalmente ligada
- 30 a uma região de iniciação de transcrição que é heteróloga a sequência de codificação.

A região de terminação pode ser nativa da região de início da transcrição, pode ser nativa com o polinucleotídeo operacionalmente ligado que codifica o elemento de silenciamento, pode ser nativa com a planta hospedeira, ou pode ser derivada de outra fonte (ou seja, estrangeira ou heteróloga) ao promotor, o polinucleotídeo compreendendo o elemento de silenciamento, a planta hospedeira, ou qualquer combinação dos dois. Regiões de terminação convenientes estão disponíveis a partir do plasmídeo Ti de *A. tumefaciens*, como a octopina sintase e regiões de terminação da 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 Acids Res.* 15:9627-9639.

Modificações de sequências adicionais são conhecidas por aumentar a expressão do gene em uma célula hospedeira. Estes incluem a eliminação de sequências de codificação de sinais de poliadenilação espúrios, sinais de sítio de ligação intron-exon, repetições tipo transposon, e outras sequências bem caracterizadas que podem ser prejudiciais à expressão do gene. O conteúdo GC da sequência pode ser ajustado a níveis médios para determinados hospedeiros celulares, como calculado por referência a genes conhecidos expressos na célula hospedeira. Sempre que possível, a sequência é modificada para evitar estruturas de secundárias de mRNA de grampos previstos.

Na elaboração do cassete de expressão, os fragmentos de DNA diferentes podem ser manipulados de modo a fornecer as sequências de DNA na orientação correta e, quando apropriado, no quadro de leitura adequado. Para este fim, adaptadores ou

ligadores podem ser empregados para juntar os fragmentos de DNA ou outras manipulações que possam estar envolvidas no fornecimento para sítios de restrição convenientes, remoção de DNA supérfluo, a remoção de sítios de restrição, ou coisa parecida. Para este propósito, em mutagênese in vitro, reparo primário, restrição, anelamento, re-substituições, por exemplo, transições e transversões, podem estar envolvidos.

Um certo número de promotores pode ser utilizado na prática da invenção. O polinucleotídeo que codifica o elemento de silenciamento pode ser combinado com outros promotores constitutivos, tecido-preferidos para expressão em plantas.

Tais promotores constitutivos incluem, por exemplo, o núcleo promotor do promotor Rsyn7 e outros promotores constitutivos divulgados no WO 99/43838 e na Patente US No. 6.072.050, o núcleo promotor CaMV 35S (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) *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 (Patente US No. 5.659.026), e assim por diante. Outros promotores constitutivos incluem, por exemplo, Patentes US n°s 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.

Um promotor induzível, por exemplo, um promotor induzível por patógeno também pode ser empregado. Tais promotores incluem aqueles relacionados com proteínas patogênicas (proteínas PR), que são induzidas após a 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) *Mol Plant. Virol.* 4:111-116. Veja também WO 99/43819, aqui incorporado por referência.

De interesse são os promotores que são expressos localmente ou perto do sítio de infecção pelo 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. Conct.* 2:93-98; e Yang (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14972-14977. Veja também, Chen et al. (1996) *J. Plant* 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; Patente US No. 5.750.386 (nematodeo-induzível); e as referências citadas nele. De particular interesse é o promotor induzível para o gene PRms do milho, cuja expressão é induzida pelo patógeno *Fusarium moniliforme* (ver, por exemplo, Cordero et al. (1992) *Physiol. Mol. Path Plant.* 41:189 -200).

Além disso, como patógenos encontram entrada em plantas através de feridas ou danos produzidos por insetos, um promotor induzível por ferida pode ser utilizado nas construções da invenção. Tais promotores induzíveis por ferida incluem o gene inibidor da protease de batata (pin II) (Ryan (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28:425-449, Duan et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:494-498); wun1 e wun2, Patente US No. 5428148, e win1 win2 (Stanford et al. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215:200-208); systemin (McGurl et al. (1992), *Science* 225:1570-1573); WIP1 (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323:73-76); gene MPI (Corderok et al. (1994) *J. Plant* 6 (2) :141-150), e assim por diante, aqui incorporados por referência.

Promotores regulados quimicamente podem ser usados 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 induzível por agentes químicos, onde a aplicação do produto químico induz a expressão gênica, ou um promotor repressível por química, onde a aplicação do produto químico reprime a expressão do gene. Promotores induzíveis quimicamente são conhecidos no estado da técnica e incluem, mas não estão limitados a, promotor do milho In2-2, que é ativado por agentes de proteção herbicida benzenosulfonamida, o promotor GST do milho, que é ativado por compostos eletrofílicos hidrofóbicos que são utilizados como herbicidas pré-emergentes, e o promotor PR-1a do tabaco, que é ativado pelo ácido salicílico. Outros promotores regulados quimicamente de interesse incluem promotores esteróides-responsivos (ver, por exemplo, o promotor induzível por glicocorticóides em Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 88:10421-10425 e McNellis et al. (1998) *J Plant.* 14 (2) : 247-257) e promotores induzíveis por tetraciclina e repressíveis por tetraciclina (ver, por exemplo, Gatz et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237, e Patentes US nºs 5.814.618 e 5.789.156), aqui incorporados por referência.

Promotores preferenciais de tecido podem ser utilizados para direcionar uma maior expressão dentro de um tecido de uma planta particular. Promotores preferidos de tecido incluem 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. Promotores deste tipo podem ser modificados, se necessário, para a fraca expressão.

Promotores preferenciais de folhas são conhecidos na arte. Ver, 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. USA* 90(20):9586-9590.

Promotores preferenciais de raiz são conhecidos e podem ser selecionados entre os muitos disponíveis na literatura ou isolados de novo a partir de várias espécies compatíveis. Ver, por exemplo, Hire et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 20(2):207-218 (gene glutamina sintetase específico de raiz de soja), Keller e Baumgartner (1991), *Plant Cell* 3 (10) :1051-1061 (elemento controle específico de raiz no gene GRP 1,8 do feijão francês); Sanger et al. (1990) *Mol Plant. Biol.* 14(3):433-443 (promotor específico de raiz do gene manopina sintase (MAS) de *Agrobacterium tumefaciens*) e Miao et al. (1991) *Plant Cell* 3(1):11-22 (clone de cDNA de comprimento total codificando glutamina sintetase citosólica (GS), que se expressa nas raízes e nódulos de raiz de soja). Veja também Bogusz et al. (1990), *Plant Cell* 2 (7) :633-641, onde dois promotores específicos de raiz isolados dos genes da hemoglobina a partir de não legumes fixadores de nitrogênio *Parasponia andersonii* e os respectivos não legumes não fixadores de nitrogênio *Trema tomentosa* são

descritos. Os promotores destes genes foram ligados a um gene repórter β -glucuronidase e introduzidos em ambos não legume *Nicotiana tabacum* e da leguminosa *Lotus corniculatus*, e em ambas a atividade do promotor específico de raiz foi preservada. Leach e Aoyagi (1991) descrevem sua análise dos promotores dos genes de indução de raiz de *Agrobacterium rhizogenes* altamente expressos rolC e rolD (ver *Plant Science* (Limerick) 79 (1) :69-76). Eles concluíram que potenciadores e determinantes de DNA preferenciais de tecido são dissociados nestes promotores. Teeri et al. (1989) utilizou fusão do gene lacZ para mostrar que o gene T-DNA de *Agrobacterium* codificando octopina sintetase é especialmente ativo na epiderme da ponta da raiz e que o gene TR2' é específico da raiz na planta intacta e estimulado por ferimentos no tecido foliar, uma combinação especialmente desejável de características para uso com um gene inseticida ou larvicida (ver *EMBO J.* 8 (2) :343-350). O gene TR1', fundido a nptII (neomicina fosfotransferase II) apresentou características semelhantes. Promotores raiz preferidos adicionais incluem o gene promotor VfENOD-GRP3 (Kuster et al. (1995) *Plant Mol. Biol.* 29 (4) :759-772), e promotor rolB (Capana et al. (1994) *Plant Mol. Biol.* 25 (4): 681-691. Veja também Patentes US nº s 5.837.876, 5.750.386, 5.633.363, 5.459.252, 5.401.836, 5.110.732 e 5.023.179.

Em uma concretização desta invenção, o promotor expressado por plantas é um promotor específico vascular como um promotor específico de floema. Um promotor "vascular específico", como utilizado aqui, é um promotor que é, no mínimo, expresso em células vasculares, ou um promotor que é preferencialmente expresso em células vasculares. Expressão de um promotor específico vascular não precisa ser exclusivamente nas células vasculares, expressão em outros tipos de células ou tecidos é

possível. Um "promotor específico de floema", como aqui utilizado, é um promotor expressável pela planta que é, no mínimo, expresso em células do floema, ou um promotor que é preferencialmente expresso em células de floema.

5 Expressão de um promotor específico de floema não precisa ser exclusivamente em células de floema, a expressão em outros tipos de células ou tecidos, por exemplo, o tecido do xilema, é possível. Em uma concretização desta invenção, um promotor específico de floema é um promotor expressável pela planta e
 10 pelo menos expresso nas células do floema, onde a expressão em células de não floema é mais limitada (ou ausente) em comparação com a expressão em células de floema. Exemplos de promotores adequados específico vascular ou específico de floema, de acordo com esta invenção incluem, mas não estão
 15 limitados aos promotores selecionados do grupo consistindo em: promotores SCSV3, SCSV4, SCSV5 e SCSV7 (Schunmann et al. (2003) *Plant Functional Biology* 30:453-60, promotor do gene rolC de *Agrobacterium rhizogenes* (Kiyokawa et al. (1994), *Plant Physiology* 104:801-02; Pandolfini et al. (2003) *Biomedcentral*
 20 (BMC) *Biotechnology* 03:07 (www.biomedcentral.com/1472-6750/3/7), Graham et al. (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:729-35; Guivarc'h et al. (1996); Almon et al. (1997) *Plant Physiol.* 115:1599-607, o promotor do gene rolA de *Agrobacterium rhizogenes* (Dehio et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 23:1199-210),
 25 o promotor do gene 5 T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* (Korber et al. (1991) 10:3983-91 *J. EMBO*), o promotor do gene RSs1 sacarose sintase de arroz (Shi et al. (1994) *J. Exp. Bot.* 45:623-31), o promotor Badnavirus de manchas amarelas *Commelina* ou CoYMV (Medberry et al. (1992), *Plant Cell* 4:185-92; Zhou et al. (1998) *Chin. J. Biotechnol.* 14:9-16), o promotor CFDV ou
 30 vírus da decadência foliar de coco (Rohde et al. (1994) *Plant*

Mol. Biol. 27:623-28; Hehn e Rhode (1998) *J. Gen. Virol.* 79:1495-99), o promotor RTBV ou vírus baciliforme tungro do arroz (Yin e Beachy (1995) *J. Plant* 7:969-80; Yin et al. (1997) *J. Plant* 12:1179-80), o gene da ervilha GS3A glutamina sintetase (Edwards et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 87:3459-63; Brears et al. (1991) *J. Plant* 1:235-44), os promotores inv CD111 e inv CD141 dos genes invertase da batata (Hedley et al. (2000) *J. Exp. Botany* 51:817-21), o promotor isolado de *Arabidopsis* mostrou ter expressão específica do floema no tabaco por Kertbundit et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5212-16), a região promotora VAHOX1 (Tornerio et al. (1996) *J. Plant* 9:639-48), o promotor do gene invertase da parede celular da ervilha (Zhang et al. (1996) *Plant Physiol.* 112:1111-17), o promotor da proteína endógena do algodão relacionada com quitinase de pedido de patente US publicado 20030106097, um promotor do gene do ácido invertase de cenoura (RamLoch-Lorenz et al. (1993) *The Plant J.* 4:545-54), o promotor do transportador de sulfato geneSultr1; 3 (Yoshimoto et al. (2003) *Plant Physiol.* 131:1511-17), um promotor de um gene sacarose sintase (Nolte e Koch (1993) *Plant Physiol.* 101:899-905) e o promotor do gene transportador de sacarose dotabaco (Kuhn et al. (1997) *Science* 275-1298-1300).

Promotores possíveis também incluem o promotor Black Cherry de prunasina hidrolase (PH DL1.4 PRO) (Patente US No. 6.797.859), promotor Thioredoxin H do pepino e do arroz (Fukuda A et al. (2005) *Plant Cell Physiol.* 46 (11) :1779-86), arroz (RSs1) (Shi, T. Wang et al. (1994) *J. Exp. Bot.* 45 (274): 623-631) e promotores do milho synthese-1 de sacarose (Yang., NS. et al. (1990) *PNAS* 87:4144-4148), promotor de abóbora PP2 Guo, H. et al. (2004) *Transgenic Research* 13:559-566), promotor At SUC2 (Truernit, E. et al. (1995) *Planta* 196 (3): 564-70, At

SAM-1 (S-adenosilmetionina sintetase) (Mijnsbrugge KV. et al. (1996) *Planr. Cell. Physiol.* 37 (8): 1108-1115), e o promotor vírus baciliforme tungro do arroz (RTBV) (Bhattacharyya-Pakrasi et al. (1993) *Plant J.* 4 (1) :71-79).

5 O cassete de expressão também pode incluir um gene marcador de seleção para a seleção de células transformadas. Genes marcadores selecionáveis são utilizados para a seleção de células ou tecidos transformados. Genes marcadores incluem genes que codificam resistência aos antibióticos, como as de

10 codificação da neomicina fosfotransferase II (NEO) e higromicina fosfotransferase (HPT), bem como os genes que conferem resistência a compostos herbicidas, como o glufosinato de amônio, bromoxinil, imidazolinonas, e 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D). Marcadores selecionáveis

15 adicionais incluem marcadores fenotípicos, tais como β -galactosidase e as proteínas fluorescentes, como a proteína verde fluorescente (GFP) (Su et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 85: 610-9 e Fetter et al. (2004) *Plant Cell* 16: 215-28), proteína fluorescente ciano (CYP) (Bolte et al. (2004) *J. Cell*

20 *Science* 117:943-54 e Kato et al. (2002) *Plant Physiol* 129:913-42), e proteína fluorescente amarela (PhiYFP ã a partir de Evrogen, ver, Bolte et al. (2004), *J. Cell Science* 117 :943-54). Para mais marcadores de seleção, consulte em geral, Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3:506-511; Christopherson

25 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

30 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 Ph.D., 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 Ph.D., 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); Gill et al. (1988) *Nature* 334:721-724. Essas divulgações são aqui incorporadas por referência. A lista acima de genes marcadores de seleção não pretende ser uma limitação. Qualquer gene marcador selecionável pode ser utilizado na presente invenção.

20 VI. Composições compreendendo Elementos de Silenciamento

Um ou mais dos polinucleotídeos compreendendo o elemento de silenciamento podem ser fornecidos como uma composição externa, como um spray ou pó para a planta, parte da planta, semente, uma praga, ou uma área de cultivo. Em outro exemplo, 25 uma planta é transformada com uma construção de DNA ou cassete de expressão para expressão de pelo menos um elemento de silenciamento. Em ambas as composições, o elemento de silenciamento, quando ingerido por um inseto, pode reduzir o nível de uma sequência alvo da praga e, assim, controlar a praga (ou seja, qualquer praga da ordem Lepidoptera, como 30 *Spodoptera frugiperda*). É reconhecido que a composição pode

compreender uma célula (como célula vegetal ou uma célula bacteriana), em que um polinucleotídeo que codifica o elemento de silenciamento é estavelmente incorporado no genoma e operacionalmente ligado aos promotores ativos na célula.

5 Composições que compreendem uma mistura de células, algumas células que expressam pelo menos um elemento de silenciamento também são abrangidas. Em outras concretizações, composições compreendendo os elementos de silenciamento não estão contidas na célula. Em tais concretizações, a composição pode ser aplicada a uma área habitada por uma praga. Em uma concretização, a composição é aplicada externamente a uma planta (ou seja, por pulverização de um campo ou área de cultivo) para proteger a planta da praga.

Em uma concretização, a composição que compreende o elemento de silenciamento que controla uma praga da ordem Lepidoptera, não constitui um oligopeptídeo catiônico heterólogo para facilitar a absorção do RNAi em células de inseto. Por conseguinte, em tais concretizações, atividade inseticida ocorre nas composições da invenção (ou seja, a planta, parte da planta, células vegetais, ou micróbios), na ausência de um oligopeptídeo catiônico que é heterólogo para a planta, parte da planta ou micróbio. O oligopeptídeo catiônico é alvo não-específico e interage não especificamente com o RNA via interações eletrostáticas e neutralização de carga para penetrar as membranas e perder uma atividade específica que promove uma interação específica com uma membrana da célula.

A composição da invenção pode ainda ser formulada como isca. Nesta concretização, as composições compreendem uma substância alimentar ou um atrativo que reforça a atratividade da composição à praga.

A composição que compreende o elemento de silenciamento pode ser formulada em um veículo agriculturalmente adequado e/ou ambientalmente aceitável. Esses veículos podem ser de qualquer material animal ou vegetal, ou o ambiente a ser tratado pode tolerar. Além disso, o veículo deve ser tal que a
5 composição permanece eficaz no controle de uma praga. Exemplos desses veículos incluem água, soro fisiológico, solução de Ringer, dextrose ou outras soluções de açúcar, solução de Hank, e outras soluções aquosas de sal fisiologicamente equilibradas,
10 tampão fosfato, tampão bicarbonato e tampão Tris. Adicionalmente, a composição pode incluir compostos que aumentam a meia-vida de uma composição.

É reconhecido que os polinucleotídeos compreendendo sequências que codificam o elemento de silenciamento podem ser
15 usados para transformar organismos para fornecer ao organismo hospedeiro a produção desses componentes, e posterior aplicação do organismo hospedeiro no ambiente da praga(s) alvo. Tais organismos hospedeiros incluem baculovírus, bactérias, etc. Desta forma, a combinação de polinucleotídeos codificando o
20 elemento de silenciamento pode ser introduzida através de um vetor adequado em um hospedeiro microbiano, e o dito hospedeiro aplicado ao meio ambiente, ou às plantas ou animais.

O termo "introduzido" no contexto da inserção de um ácido nucléico em uma célula significa "transfecção" ou
25 "transformação" ou "transdução" e inclui uma referência à incorporação de um ácido nucléico em uma célula eucariótica ou procariótica, onde o ácido nucléico pode ser estavelmente incorporado no genoma da célula (por exemplo, cromossomo, plasmídeo, plastídeo, ou DNA mitocondrial), convertido em um
30 replicon autônomo ou transitoriamente expresso (por exemplo, mRNA transfetado).

Hospedeiros microbianos que são conhecidos para ocupar a "fitosfera" (filoplano, filosfera, rizosfera e/ou rizoplana) de uma ou mais culturas de interesse podem ser selecionados. Estes microorganismos são selecionados de modo a serem capazes de

5 competir com sucesso no ambiente específico com os microorganismos do tipo selvagem, prever a manutenção estável e a expressão das sequências de codificação do elemento de silenciamento, e desejavelmente, proporcionar uma melhor proteção dos componentes da degradação ambiental e inativação.

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

15 *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* e *Alcaligenes*, fungos, especialmente leveduras, por exemplo, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* e *Aureobasidium*. De particular interesse são tais espécies de bactérias da fitosfera como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas*

20 *fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacteria*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus*, *Clavibacter xyli* e *Azotobacter vinlandir*, e espécies de leveduras da fitosfera como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R.*

25 *marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces rosues*, *S. odor*, *Kluyveromyces veronae*, e *Aureobasidium pollulans*. De particular interesse são os microorganismos pigmentados.

30 Uma série de métodos está disponível para a introdução do polinucleotídeo compreendendo o elemento de silenciamento no

hospedeiro microbiano em condições que permitam a manutenção estável e a expressão de tais nucleotídeos codificando sequências. Por exemplo, cassetes de expressão podem ser construídos, que incluem as construções de nucleotídeo de interesse operacionalmente ligadas com os sinais regulatórios de tradução e transcrição para expressão das construções de nucleotídeo, e uma sequência de nucleotídeos homóloga com uma sequência no organismo hospedeiro, sendo que a integração irá ocorrer, e/ou um sistema de replicação que é funcional no hospedeiro, em que ou a manutenção estável ou a integração irá ocorrer.

Sinais regulatórios transcricionais e traducionais incluem, mas não estão limitados a, promotores, sítios de início da iniciação transcricional, operadores, ativadores, melhoradores, outros elementos regulatórios, sítios de ligação ribossomal, códon de iniciação, sinais de terminação, e assim por diante. Ver, por exemplo, Patentes US nº s 5.039.523 e 4.853.331; EPO 0480762A2; Sambrook et al. (2000); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY); Davis et al. (1980) *Advanced Bacterial Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), e as referências citadas nele.

Células hospedeiras adequadas incluem os procariontes e eucariontes inferiores, tais como fungos. Procariontes ilustrativos, ambos Gram-negativos e Gram-positivos, incluem *Enterobacteriaceae*, tais como *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella* e *Proteus*; *Bacillaceae*; *Rhizobiceae*, como *Rhizobium*; *Spirillaceae*, como fotobactéria, *Zymomonas*, *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*, que incluem leveduras, como *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*; e leveduras *Basidiomicetas*, tais como *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, e assim por diante.

5 Características de interesse particular na seleção de uma célula hospedeira para fins da invenção incluem a facilidade de introdução da sequência de codificação no hospedeiro, a disponibilidade de sistemas de expressão, a eficiência de expressão, a estabilidade no hospedeiro, e a presença de
10 recursos genéticos auxiliares. Características de interesse para uso, como uma microcápsula pesticida, incluem qualidades protetoras, tais como paredes celulares espessas, pigmentação e acondicionamento intracelular ou formação de corpos de inclusão; afinidade foliar, ausência de toxicidade em
15 mamíferos; atratividade para as pragas ingerirem, e assim por diante. Outras considerações incluem a facilidade de formulação e manipulação, economia, estabilidade de armazenamento, e assim por diante.

 Organismos hospedeiros de interesse particular incluem
20 leveduras, como *Rhodotorula* spp., *Aureobasidium* spp., *Saccharomyces* spp., e *Sporobolomyces* spp., organismos filoplanos como *Pseudomonas* spp., *Erwinia* spp. e *Flavobacterium* spp., e outros organismos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus*
25 *thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, e assim por diante.

 As sequências que codificam os elementos de silenciamento abrangidos pela invenção podem ser introduzidas em microrganismos que se multiplicam nas plantas (epífitas) para
30 fornecer esses componentes às pragas-alvo potenciais. Epífitas,

por exemplo, podem ser bactérias gram-positivas ou gram-negativas.

O elemento de silenciamento pode ser fermentado em uma bactéria hospedeira e as bactérias resultantes processadas e
5 usadas como um spray microbiano da mesma forma que as cepas de *Bacillus thuringiensis* têm sido usados como sprays inseticidas. Qualquer microorganismo adequado pode ser usado para essa finalidade. *Pseudomonas* tem sido usadas para expressar endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* como proteínas
10 encapsuladas e as células resultantes processadas e pulverizadas como um inseticida Gaertner et al. (1993), em *Advanced Engineered Pesticides*, ed. L. Kim (Marcel Decker, Inc.).

Alternativamente, os componentes da invenção são
15 produzidos pela introdução de genes heterólogos em células hospedeiras. Expressão de sequências heterólogas resultam, direta ou indiretamente, na produção intracelular do elemento de silenciamento. Essas composições podem ser formuladas de acordo com técnicas convencionais para aplicação no ambiente
20 hospedando uma praga alvo, por exemplo, solo, água e folhagem das plantas. Ver, por exemplo, EPA 0192319, e as referências citadas nela.

Na presente invenção, um microorganismo transformado pode ser formulado com um veículo aceitável separado ou em conjunto
25 com composições que são, por exemplo, uma suspensão, uma solução, uma emulsão, um talco, um granulado dispersível, um pó molhável, e uma emulsão concentrada, um aerossol, um grânulo impregnado, um adjuvante, uma pasta revestida, e também encapsulações em, por exemplo, substâncias poliméricas.

30 Tais composições divulgadas acima podem ser obtidas pela adição de um agente ativo de superfície, um veículo inerte, um

conservante, um umectante, um estimulante de alimentação, um atrativo, um agente encapsulante, um aglutinante, um emulsificante, um corante, um protetor UV, um tampão, um agente de fluxo ou fertilizante, doadores de micronutrientes, ou
5 outras preparações que influenciam o crescimento das plantas. Um ou mais agroquímicos, incluindo, mas não limitado a, herbicidas, inseticidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, moluscicidas, acarácidas, reguladores de crescimento vegetal, auxiliadores de colheita e adubos, podem ser combinados com
10 veículos, surfactantes ou adjuvantes habitualmente utilizados na técnica de formulação ou outros componentes para facilitar o manuseio do produto e aplicação para pragas-alvo específicas. Veículos apropriados e adjuvantes podem ser sólidos ou líquidos e correspondem a substâncias normalmente empregadas em
15 tecnologia da formulação, por exemplo, natural ou substâncias minerais regeneradas, solventes, dispersantes, agentes umectantes, unificadores, ligadores, ou fertilizantes. Os ingredientes ativos da presente invenção (ou seja, pelo menos um elemento de silenciamento) são normalmente aplicados na
20 forma de composições e podem ser aplicados na área de lavoura, planta ou semente a ser tratada. Por exemplo, as composições podem ser aplicadas ao grão em preparação ou durante o armazenamento em uma caixa de grãos ou silo, etc. As composições podem ser aplicadas simultaneamente ou em sucessão
25 com outros compostos. Métodos de aplicação de um ingrediente ativo ou uma composição que contém pelo menos um elemento de silenciamento incluem, mas não estão limitados a, aplicação foliar, revestimento de sementes e aplicação no solo. O número de aplicações e a taxa de aplicação dependem da intensidade de
30 infestação pela praga correspondente.

Agentes tensoativos apropriados incluem, mas não estão limitados a, compostos aniônicos como um carboxilato de, por exemplo, um metal; carboxilato de uma cadeia longa de ácidos graxos, um N-acilsarcosinato, mono- ou di-ésteres de ácido fosfórico com etoxilatos de álcool graxo ou sais de ésteres de tal; sulfatos de álcoois graxos, tais como dodecil sulfato de sódio, octadecil sulfato de sódio, ou cetil sulfato de sódio; sulfato de álcool graxo etoxilado; sulfatos alquilfenóis etoxilados, sulfonatos de lignina; sulfonatos de petróleo; alquil aril sulfonato como alquil-benzeno sulfonatos ou alquilnaftalenos sulfonatos inferiores, por exemplo, butil naftaleno sulfonato, sais de naftaleno formaldeído sulfonato condensados; sais de fenol-formaldeído sulfonatos condensados, sulfonatos mais complexos, como amido sulfonatos, por exemplo, o produto da condensação sulfonatada de ácido oléico e N-metil taurina; ou os dialquil sulfosuccinatos, por exemplo, o sulfonato de sódio ou dioctil succinato. Agentes não-iônicos incluem produtos de condensação de ésteres de ácidos graxos, álcoois graxos, amidos de ácidos graxos ou alquil-graxo ou fenóis substituídos por alquenil com óxido de etileno, ésteres graxos de éteres de álcool poliídrico, por exemplo, ésteres de ácidos graxos sorbitana, produtos da condensação de tais ésteres com óxido de etileno, por exemplo, ésteres de ácidos graxos polioxietileno de sorbitana, copolímeros em bloco de óxido de etileno e óxido de propileno, glicóis acetilênicos como 2,4,7,9-tetraetila-5-decin-4,7-diol, ou etoxilados glicóis acetilênicos. Exemplos de um agente ativo de superfície catiônica incluem, por exemplo, um alifático mono-, di- ou poliaminas, tais como acetato, naftaleno ou oleato, ou amina contendo oxigênio como um óxido de amina de polioxietileno alquilamina, uma amina ligada a amida preparada pela

condensação de um ácido carboxílico com uma di- ou poliamina, ou um sal de amônio quaternário.

Exemplos de materiais inertes incluem, mas não estão limitados a, minerais inorgânicos tais como caulim, filossilicatos, carbonatos, sulfatos, fosfatos, ou materiais botânicos como cortiça, sabugo de milho em pó, casca de amendoim, casca de arroz e cascas de nozes.

As composições compreendendo o elemento de silenciamento podem ser uma forma adequada para aplicação direta ou como um concentrado da composição primária que requer diluição com uma quantidade adequada de água ou outro diluente antes da aplicação.

As composições (incluindo os microorganismos transformados) podem ser aplicadas no ambiente de uma praga de inseto (como uma praga da ordem Lepidoptera) por, por exemplo, pulverização, atomização, sovação, dispersão, revestimento ou vazamento, introduzindo dentro ou no solo, introduzindo na água de irrigação, por tratamento de sementes ou aplicação geral ou pó no momento em que a praga começou a aparecer ou antes do aparecimento de pragas como uma medida de proteção. Por exemplo, a composição(s) e/ou microorganismo(s) transformado podem ser misturados com os grãos para proteger o grão durante o armazenamento. Geralmente, é importante obter um bom controle de pragas nos estágios iniciais de crescimento da planta, pois este é o momento em que a planta pode ser mais severamente danificada. As composições podem convenientemente conter outro inseticida se este for considerado necessário. Em uma concretização da invenção, a composição(s) é aplicada diretamente ao solo, em uma época de plantio, na forma granular de uma composição de um veículo e células mortas de uma cepa de *Bacillus* ou microorganismo transformado da invenção. Outra

concretização é uma forma granular de uma composição que compreende um agroquímico, como, por exemplo, um herbicida, um inseticida, um adubo, em um veículo inerte, e células mortas de uma cepa de *Bacillus* ou microorganismo transformado da invenção.

VII. Plantas, partes das plantas, e métodos de introdução de sequências em Plantas

Em uma concretização, os métodos da invenção envolvem a introdução de um polipeptídeo ou polinucleotídeo em uma planta. "Introdução" destina-se a significar a apresentação da planta ao polinucleotídeo ou polipeptídeo de tal forma que a sequência ganhe acesso ao interior de uma célula da planta. Os métodos da invenção não dependem de um método especial para a introdução de uma sequência em uma planta, só que o polinucleotídeo ou polipeptídeo ganhe acesso ao interior de, pelo menos, uma célula da planta. Métodos para a introdução de polinucleotídeo ou polipeptídeos em plantas são conhecidos na arte, incluindo, mas não limitado a métodos de transformação estável, métodos de transformação transitória, e métodos mediados por vírus.

"Transformação estável" destina-se a significar que a construção de nucleotídeo introduzida em uma planta integra no genoma da planta e é capaz de ser herdada pelos descendentes da mesma. "Transformação transitória" destina-se a significar que um polinucleotídeo é introduzido na planta e não se integra no genoma da planta ou um polipeptídeo é introduzido em uma planta.

Protocolos de transformação, bem como protocolos para a introdução de polipeptídeos ou sequências polinucleotídicas em plantas podem variar dependendo do tipo de planta ou célula de planta, ou seja, monocotiledônea ou dicotiledônea, orientada

para a transformação. Métodos adequados de introdução de polipeptídeos e polinucleotídeos em células vegetais 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* (Patente US No. 5.563.055 e Patente US No. 5.981.840), transferência direta do gene (Paszkowski et al. (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722) e aceleração de partículas balísticas (ver, por exemplo, Patente US n°s 4.945.050; Patente US No. 5.879.918; Patente US Nos. 5.886.244, e, 5.932.782; Tomes et al. (1995) em *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg e Phillips Springer-Verlag, Berlin), McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6:923-926) e transformação de LEC1 (WO 00/28058). Ver também 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) em *Vitro Cell Dev. Biol.* 27p:175-182 (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) 6:559-563 *Biotechnology* (milho); Patentes US n°s 5.240.855, 5.322.783 e, 5.324.646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444 (milho); Fromm et al. (1990) 8:833-839 *Biotechnology* (milho); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature* (Londres) 311:763-764; Patente US No. 5.736.369 (cereais); Bytebier et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (Liliaceae); De Wet et al. (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

Kaeppeler et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (transformação mediada por whisker); D'Halluin et al. (1992), *Plant Cell* 4:1495-1505 (eletroporação); Li et al. (1993), *Plant Cell Reports* 12:250-255 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.

Em concretizações específicas, as sequências de elemento de silenciamento da invenção podem ser fornecidas a uma planta usando uma variedade de métodos de transformação transiente. Tais métodos transientes incluem, mas não estão limitados a, introdução das proteínas ou variantes e fragmentos desses diretamente na planta ou a introdução do transcrito na planta. Tais métodos incluem, por exemplo, microinjeção ou bombardeamento de partículas. Veja, por exemplo, Crossway et al. (1986) *Mol Gen. Genet.* 202:179-185; Nomura et al. (1986) *Sci. Plant.* 44:53-58; Hepler et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. 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, polinucleotídeos podem ser transitoriamente transformados em plantas, utilizando técnicas conhecidas na arte. Essas técnicas incluem o sistema de vetor viral e a precipitação do polinucleotídeo de uma forma que se opõe a posterior liberação do DNA. Assim, a transcrição do DNA ligado à partícula pode ocorrer, mas a frequência com que é liberado para se integrar ao genoma é bastante reduzida. Tais métodos incluem o uso de partículas revestidas com polietilimina (PEI; Sigma # P3143).

Em outras concretizações, o polinucleotídeo da invenção pode ser introduzido em plantas colocando as plantas em contato com um vírus ou ácidos nucleicos virais. Geralmente, esses

métodos envolvem incorporação de uma construção de nucleotídeo da invenção dentro de um DNA viral ou uma molécula de RNA. Além disso, é reconhecido que os promotores da invenção abrangem também os promotores utilizados para a transcrição pelas RNA polimerase virais. Métodos para a introdução de polinucleotídeos em plantas e expressão de uma proteína codificada nele, envolvendo DNA viral ou moléculas de RNA, são conhecidos na arte. Veja, por exemplo, Patentes US nº s. 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367, 5.316.931 e Porta et al. (1996), *Molecular Biotechnology* 5:209-221, aqui incorporados por referência.

Métodos são conhecidos no estado da técnica para a inserção de um polinucleotídeo alvo em um local específico no genoma da planta. Em uma concretização, a inserção do polinucleotídeo em um local genômico desejado é conseguida através de um sistema de recombinação sítio específico. Ver, por exemplo, WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855 e WO99/25853, os quais são aqui incorporados por referência. Resumidamente, o polinucleotídeo da invenção pode estar contido no cassete de transferência ladeado por dois sítios de recombinação não recombinagênicos. O cassete de transferência é introduzido em uma planta tendo incorporado de forma estável no seu genoma um sítio alvo que é ladeado por dois sítios de recombinação não recombinagênicos que correspondem aos sítios do cassete de transferência. Uma recombinase adequada é fornecida e o cassete de transferência é integrado no local de destino. O polinucleotídeo de interesse é, assim, integrado em uma posição cromossômica específica no genoma da planta.

As células que foram transformadas podem ser cultivadas em plantas de acordo com métodos convencionais. Veja, por exemplo, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Essas

plantas podem ser cultivadas, e polinizadas com a mesma cepa transformada ou cepas diferentes, e os descendentes resultantes tendo expressão constitutiva da característica fenotípica desejada identificada. Duas ou mais gerações podem ser

5 cultivadas para garantir que a expressão da característica fenotípica desejada seja mantida de forma estável e herdada e, em seguida, as sementes colhidas para garantir que a expressão da característica fenotípica desejada seja alcançada. Desta forma, a presente invenção fornece sementes transformadas

10 (também conhecidas como "sementes transgênicas") com um polinucleotídeo da invenção, por exemplo, um cassete de expressão da invenção, estavelmente incorporado ao seu genoma.

Como usado aqui, o termo planta inclui células vegetais, protoplastos vegetais, cultura de células do tecido vegetal a

15 partir da qual as plantas podem ser regeneradas, calos de plantas, pedaços de plantas e células vegetais que são intactas nas plantas ou partes de plantas, tais como embriões, pólen, óvulos, sementes, folhas, flores, galhos, frutos, sementes, grãos, espigas, cascas, caules, raízes, pontas de raízes,

20 anteras e assim por diante. Grãos destinam-se a significar a semente madura produzida por agricultores comerciais para fins de crescimento ou reprodução das espécies. Descendentes, variantes, e mutantes das plantas regeneradas também estão incluídos no âmbito da invenção, desde que essas partes

25 contenham os polinucleotídeos introduzidos.

A presente invenção pode ser utilizada para transformação de qualquer espécie vegetal, incluindo, mas não limitada a, monocotiledôneas e dicotiledôneas. Exemplos de espécies de plantas de interesse incluem, mas não estão limitados a, milho

30 (*Zea mays*), *Brassica* sp. (por exemplo, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), em particular as espécies de *Brassica* úteis como

- fontes de óleo de semente, alfafa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeio (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), milho (ex.: milheto (*Pennisetum glaucum*), milheto proso (*Panicum miliaceum*), milheto foxtail
- 5 (*Setaria italica*), capim (*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 hirsutum*),
- 10 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*), figo (*Ficus casica*), guava (*Psidium guajava*),
- 15 mango (*Mangifera indica*), oliva (*Olea europaea*), papaia (*Carica papaya*), caju (*Anacardium occidentale*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), nozes (*Prunus amygdalus*), beterraba (*Beta vulgaris*), cana (*Saccharum* spp.), aveia, cevada, legumes, plantas ornamentais, e coníferas.
- 20 Vegetais incluem tomates (*Lycopersicon esculentum*), alface (por exemplo, *Lactuca sativa*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), feijão Lima (*Phaseolus limensis*), ervilhas (*Lathyrus* spp.), e membros do gênero *Cucumis*, como pepino (*C. sativus*), melão (*C. cantalupensis*) e melão cantaloupe (*C. melo*). Ornamentais
- 25 incluem Azaléia (*Rhododendron* spp.), hortênsia (*Hydrangea macrophylla*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipas (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petúnias (*Petunia hybrida*), cravos (*Dianthus caryophyllus*), poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) e crisântemo.
- 30 Coníferas que podem ser empregadas na prática da presente invenção incluem, por exemplo, pinheiros, como mudas de pinus

(*Pinus taeda*), corte de pinus (*Pinus elliotti*), pinheiro ponderosa (*Pinus ponderosa*), pinheiro lodgepole (*Pinus contorta*), e o pinheiro de Monterey (*Pinus radiata*), Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*); cicuta ocidental (*Tsuga canadensis*); Sitka spruce (*Picea glauca*); sequóia (*Sequoia sempervirens*), abetos verdadeiros, tais como abeto prata (*Abies amabilis*) e abeto balsâmico (*Abies balsamea*); e cedros, como cedro vermelho ocidental (*Thuja plicata*) e cedro-amarelo do Alaska (*C. hamaecyparis nootkatensis*). Em concretizações específicas, as plantas da presente invenção são plantas de cultivo (por exemplo, milho, alfafa, girassol, Brassica, soja, algodão, cártamo, amendoim, sorgo, trigo, milho, tabaco, etc). Em outras concretizações, as plantas de milho e soja são ótimas, e ainda outras plantas de milho das concretizações são ótimas.

Outras plantas de interesse incluem plantas de grão que fornecem sementes de interesse, plantas, sementes oleaginosas e leguminosas. Sementes de interesse incluem sementes de grãos, como milho, trigo, cevada, arroz, sorgo, centeio, etc. Plantas de óleo de sementes incluem algodão, soja, cártamo, girassol, Brassica, milho, alfafa, palma, coco, etc. Plantas leguminosas incluem feijão e ervilhas. Feijões incluem guar, alfarroba, feno-grego, soja, feijão de jardim, feijão fradinho, feijão-da-china, feijão lima, feijão fava, lentilhas, grão de bico, etc

VIII. Métodos de uso

Os métodos da invenção incluem métodos para controlar uma praga (ou seja, praga da ordem Lepidoptera, como *Spodoptera frugiperda*). O método inclui a alimentação de uma composição a uma praga que inclui um elemento de silenciamento da invenção, em que o dito elemento de silenciamento, quando ingerido por

uma praga (ou seja, pragas da ordem Lepidoptera, como *Spodoptera frugiperda*), reduz o nível de um polinucleotídeo-alvo da praga e, assim, controla a praga. A praga pode ser alimentada com o elemento de silenciamento numa variedade de maneiras. Por exemplo, em uma concretização, o polinucleotídeo compreendendo o elemento de silenciamento é introduzido em uma planta. Como a Lepidoptera se alimenta na planta ou parte dela expressando estas sequências, o elemento de silenciamento é entregue à praga. Quando o elemento de silenciamento é entregue a planta dessa forma, reconhece-se que o elemento de silenciamento pode ser expresso constitutivamente ou, alternativamente, pode ser produzido em uma forma de fase específica, utilizando os vários promotores induzíveis ou tecido preferidos ou desenvolvidamente regulados que são discutidos no presente documento. Em concretizações específicas, o elemento de silenciamento expresso nas raízes, caule ou haste, folha incluindo pedúnculo, xilema e floema, frutos ou tecidos reprodutivos, seda, flores e todas as partes dela ou em qualquer combinação.

Em outro método, uma composição que compreende pelo menos um elemento de silenciamento da invenção é aplicada a uma planta. Em tais concretizações, o elemento de silenciamento pode ser formulado em um veículo agronomicamente adequado e/ou ambientalmente aceitável, que é de preferência, adequado para a dispersão em campos. Além disso, o veículo pode incluir também os compostos que aumentam a meia vida da composição. Em concretizações específicas, a composição que compreende o elemento de silenciamento é formulada de modo tal que persiste no meio ambiente por um período de tempo suficiente para permitir que ela seja entregue a uma praga. Em tais concretizações, a composição pode ser aplicada a uma área

habitada por uma praga. Em uma concretização, a composição é aplicada externamente em uma planta (ou seja, pulverizando um campo) para proteger a planta de pragas.

Em certas concretizações, as construções da presente invenção podem ser empilhadas com qualquer combinação de sequências de polinucleotídeo de interesse a fim de criar plantas com uma característica desejada. Uma característica, como aqui utilizada, refere-se ao fenótipo derivado de uma sequência particular ou grupos de sequências.

Por exemplo, os polinucleotídeos da presente invenção podem ser empilhados com quaisquer polinucleotídeos codificando polipeptídeos tendo atividade pesticida e/ou inseticida, tais como outras proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* (descritas nas Patentes US n°s 5.366.892, 5.747.450, 5.737.514, 5.723.756; 5.593.881, e Geiser et al. (1986) *Gene* 48:109), lectinas (Van Damme et al. (1994) *Plant Mol. Biol.* 24:825, pentina (descrita na Patente US No. 5.981.722), e assim por diante. As combinações geradas também podem incluir várias cópias de qualquer um dos polinucleotídeos de interesse. Os polinucleotídeos da presente invenção também podem ser guardados em qualquer outro gene ou combinação de genes para produzir plantas com uma variedade de combinações de características desejadas, incluindo mas não limitada a, características desejáveis para alimentação animal, tais como genes de óleo superior (por exemplo, Patente US No. 6.232.529); aminoácidos equilibrados (por exemplo, ácidos, hordotioninas (Patentes US n°s 5.990.389, 5.885.801, 5.885.802 e 5.703.409); lisina superior de cevada (Williamson et al. (1987) *Eur. J. Biochem* 165:99-106.; e WO 98/20122) e proteínas superiores de metionina (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)); digestibilidade aumentada (por exemplo, modificação de proteínas de armazenamento (Pedido US No. de Série 10/053,410, depositado em 7 de novembro de 2001) e tioredoxinas; (Pedido US No. de Série 10/005, 429, depositado em 03 de dezembro de 2001)), a divulgação que estão aqui incorporadas por referência.

Os polinucleotídeos da presente invenção também podem ser empilhados com características desejáveis para a doença ou a resistência a herbicidas (por exemplo, genes de desintoxicação da fumonisina (Patente US No. 5.792.931); avirulência e genes de resistência a doença (Jones *et al.* (1994) *Science* 266:789; Martin *et al.* (1993), *Science* 262:1432; Mindrinos *et al.* (1994) *Cell* 78:1089); mutantes de acetolactato sintase (ALS) que levam à resistência a herbicidas, como mutações S4 e/ou Hra; inibidores da glutamina sintetase como fosfinotricina ou basta (por exemplo, gene bar); e resistência ao glifosato (gene EPSPS)), e características desejáveis para processamento ou transformação de produtos como óleo superior (por exemplo, Patente US No. 6.232.529), óleos modificados (por exemplo, genes desaturase de ácidos graxos (Patentes US No. 5.952.544; WO 94/11516)); amidos modificados (por exemplo, pirofosforilases ADPG (AGPase), sintases de amido (SS), enzimas de ramificação de amido (SBE), e enzimas desramificadoras de amido (SDBE)) e polímeros ou bioplásticos (por exemplo, Patente US No. 5.602,321 beta-cetotiolase, polihidroxibutirato-sintase, e acetoacetil-CoA redutase (Schubert *et al.* (1988) *J. Bacteriol.* 170:5837-5847) facilitam a expressão de polihidroxialcanoatos (PHAs)), a divulgação é aqui incorporada por referência. Poderíamos também combinar os polinucleotídeos da presente invenção com polinucleotídeos fornecendo características agronômicas, tais como esterilidade masculina

(por exemplo, ver Patente US No. 5.583.210), robustez do caule, tempo de florescimento ou características de tecnologias de transformação, tais como regulação do ciclo celular ou gene alvo (por exemplo, WO 99/61619, WO 00/17364 e WO 99/25821), as
5 divulgações que estão aqui incorporadas por referência.

Essas combinações empilhadas podem ser criadas por qualquer método, incluindo, mas não limitado a, plantas de polinização cruzada por qualquer metodologia convencional ou topcrosses, ou transformação genética. Se as sequências são
10 empilhadas por transformar geneticamente as plantas, as sequências de polinucleotídeo de interesse podem ser combinadas em qualquer momento e em qualquer ordem. Por exemplo, uma planta transgênica que compreende uma ou mais características desejadas pode ser usada como alvo para introduzir novas
15 características de transformação subsequente. As características podem ser introduzidas simultaneamente em um protocolo de co-transformação, com os polinucleotídeos de interesse previstos por qualquer combinação de cassetes de transformação. Por exemplo, se duas sequências serão
20 introduzidas, as duas sequências podem estar contidas em cassetes de transformação separados (trans) ou contidos no mesmo cassete de transformação (cis). Expressão das sequências pode ser dirigida pelo mesmo promotor ou por promotores diferentes. Em certos casos, pode ser desejável introduzir um
25 cassete de transformação que irá suprimir a expressão do polinucleotídeo de interesse. Isto pode ser combinado com qualquer combinação de outros cassetes de supressão ou cassetes de superexpressão para gerar a combinação desejada de características da planta. É igualmente reconhecido que as
30 sequências de polinucleotídeo podem ser empilhadas em um genoma local desejado através de um sistema de recombinação sítio-

específico. Veja, por exemplo, WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855, e WO99/25853, os quais são aqui incorporados por referência.

Métodos e composições são ainda fornecidos para permitir
5 um aumento de RNAi produzido a partir do elemento de
silenciamento. Em tais concretizações, os métodos e composições
utilizam um primeiro polinucleotídeo compreendendo um elemento
de silenciamento de uma sequência-alvo da praga
operacionalmente ligado a um promotor ativo na célula vegetal
10 e, um segundo polinucleotídeo compreendendo um elemento
melhorador de supressão compreendendo a sequência-alvo da
praga, ou uma variante ativa ou fragmento do mesmo
operacionalmente ligado a um promotor ativo nas células
vegetais. A expressão combinada do elemento de silenciamento
15 com um elemento potenciador supressor leva a um aumento do RNA
inibitório produzido a partir do elemento de silenciamento
alcançável apenas com a expressão do elemento de silenciamento
sozinho. Além do aumento crescente das espécies determinadas de
RNAi em si, os métodos e as composições permitem ainda a
20 produção de uma população diversificada de espécies de RNAi que
podem aumentar a eficácia de interrupção da expressão do gene
alvo. Como tal, quando o elemento potenciador supressor é
expresso em uma célula vegetal, em combinação com o elemento de
silenciamento, os métodos e a composição podem permitir a
25 produção sistêmica de RNAi em toda a planta; a produção de
maiores quantidades de RNAi que seria observada apenas com a
construção do elemento de silenciamento sozinho, e, a carga
melhorada de RNAi para o floema da planta, proporcionando assim
um melhor controle da alimentação de floema pelos insetos
30 através de um RNAi. Assim, os vários métodos e composições
proporcionam métodos melhores para a entrega de RNA inibidores

ao organismo alvo. Veja, por exemplo, Pedido Provisório US nº 61/021,676, "Compositions and Methods for the Suppression of Target Polynucleotides", depositado em 17 de janeiro de 2008 e aqui incorporada por referência, na sua totalidade.

5 Como usado aqui, um "elemento potenciador supressor" compreende um polinucleotídeo compreendendo a sequência alvo a ser suprimida ou um fragmento ativo ou uma variante da mesma. É reconhecido que o elemento potenciador supressor não precisa ser idêntico à sequência alvo, mas sim, o supressor elemento
10 potenciador pode incluir uma variante da sequência alvo, enquanto o elemento potenciador supressor tem identidade de sequência suficiente para a sequência alvo para permitir um aumento do nível do RNAi produzido pelo elemento de silenciamento viavelmente apenas com a expressão do elemento de
15 silenciamento. Da mesma forma, o elemento potenciador supressor pode incluir um fragmento da sequência alvo, onde o fragmento é de comprimento suficiente para permitir um aumento do nível do RNAi produzido pelo elemento de silenciamento viavelmente apenas com a expressão do elemento de silenciamento. Assim, em
20 concretizações específicas, o elemento potenciador supressor compreende um fragmento ou uma variante de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo do hormônio juvenil, um polipeptídeo vacuolar, um polipeptídeo caderina, um polipeptídeo de cutícula, um fator de iniciação da tradução, um
25 polipeptídeo SAR1, um fator de alongamento, um fosfooligosacarídeo, um polipeptídeo miosina, um transportador de aminoácidos do canal de potássio, um polipeptídeo retificador de potássio internamente, um transportador de aminoácidos, um polipeptídeo tubulina, um polipeptídeo
30 ubiquitina, ribonucleoproteína nuclear de pequeno porte, ou qualquer outro polinucleotídeo de interesse divulgado aqui.

Ainda em outras concretizações, o elemento potenciador supressor compreende um polinucleotídeo estabelecido na SEQ ID NO: 10-50 ou uma variante ativa ou fragmento do mesmo.

Reconhece-se que vários elementos potenciadores
5 supressores da mesma sequência alvo ou a partir de sequências-alvo diferentes, ou de diferentes regiões da mesma sequência alvo podem ser empregados. Por exemplo, os elementos potenciadores supressores empregados podem incluir fragmentos da sequência-alvo derivada de diferentes regiões da sequência
10 alvo (ou seja, a partir de 3'UTR, sequência de codificação, intron, e/ou 5'UTR). Além disso, o elemento potenciador supressor pode estar contido em um cassete de expressão, conforme já descrito aqui, e em concretizações específicas, o elemento potenciador supressor é no mesmo ou em um vetor de DNA
15 diferente ou constructo como elemento de silenciamento. O elemento potenciador supressor pode ser operacionalmente ligado a um promotor como divulgado aqui. Reconhece-se que o elemento potenciador supressor pode ser expresso constitutivamente ou alternativamente, pode ser produzido em uma forma de fase
20 específica empregando os vários promotores induzíveis ou tecido-preferidos ou desenvolvidamente regulados que são discutidos no presente documento.

Em concretizações específicas, empregando tanto um elemento de silenciamento e o elemento potenciador supressor a
25 produção sistêmica de RNAi ocorre através da planta inteira. Em outras concretizações, as plantas ou partes das plantas da invenção têm uma carga melhorada de RNAi no floema da planta que seria observada com a expressão da construção do elemento de silenciamento sozinho e, assim, proporcionando um melhor
30 controle de floema de alimentação dos insetos através de um RNAi. Em concretizações específicas, as plantas, partes de

plantas e células vegetais da invenção podem ainda ser caracterizadas como uma permissão para a produção de uma diversidade de espécies de RNAi que pode aumentar a eficácia de interrupção da expressão do gene alvo.

5 Em concretizações específicas, a expressão combinada do elemento de silenciamento e o elemento potenciador supressor aumenta a concentração de RNA inibitório na célula vegetal, planta, parte da planta, tecido de planta ou floema em relação
10 ao nível que é atingido quando o elemento de silenciamento é expresso por si só.

 Como usado aqui, um "aumento do nível de RNA inibidor" compreende qualquer aumento estatisticamente significativo no nível de RNAi produzido em uma planta tendo a expressão combinada quando comparada com uma planta controle adequada.
15 Por exemplo, um aumento no nível do RNAi na planta, parte da planta ou célula vegetal pode incluir pelo menos cerca de 1%, cerca de 1% -5%, cerca de 5% -10%, cerca de 10% -20%, cerca de 20% -30%, cerca de 30% -40%, cerca de 40% -50%, cerca de 50% -60%, cerca de 60-70%, cerca de 70% -80%, cerca de 80% -90%,
20 cerca de 90% -100% ou mais de aumento no nível do RNAi na planta, parte da planta, células vegetais, ou floema, quando comparado a um controle adequado. Em outras concretizações, o aumento do nível do RNAi na planta, parte da planta, células vegetais, ou floema pode comportar pelo menos cerca de 1 vez,
25 cerca de 5 vezes, cerca de 5 vezes -10 vezes, cerca de 10 vezes -20 vezes, cerca de 20 vezes -30 vezes, cerca de 30 vezes -40 vezes, cerca de 40 vezes -50 vezes, cerca de 50 vezes -60 vezes, cerca de 60 vezes -70 vezes, cerca de 70 vezes -80 vezes, cerca de 80 vezes -90 vezes, cerca de 90 vezes -100
30 vezes ou mais de aumento do RNAi na planta, parte da planta, célula vegetal ou floema, quando comparado a um controle

apropriado. Métodos de ensaio de controle do nível para um aumento do nível de RNAi são discutidos em outro lugar neste documento.

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

EXPERIMENTAL

Exemplo 1. Genes-alvo específicos e elementos de silenciamento que causam atividade inseticida contra *Spodoptera frugiperda*.

10 Perturbação da função do gene do inseto através do RNAi pode produzir atividade específica contra os insetos-alvo. Esta especificidade é reforçada mediante a entrega dos dsRNAs através de plantas transgênicas. Identificação da função do gene em insetos através de RNAi tem sido largamente limitada a
15 injeção de dsRNAs. Na verdade, as experiências passadas indicam que os insetos não são capazes de uma resposta sistêmica ao RNAi com base na exposição de dsRNAs.

Conforme descrito abaixo, nós demonstramos atividade aguda de vários pares de dsRNA através de experimentos de injeção e,
20 adicionalmente, temos demonstrado antagonismo ao inseto através da ingestão de dsRNAs. Esta evidência identifica várias combinações de genes/pares de primers com claras propriedades inseticidas. O uso de dsRNAs em plantas transgênicas também aborda a complicação potencial de expressão de proteínas
25 heterólogas e os possíveis riscos de reação alérgica, atividade não-alvo e bioacumulação ou acumulação ambiental. Os dados apresentados a seguir representam o primeiro teste de ruptura destes genes particulares, resultando em atividade inseticida em organismos inteiros e os primeiros relatórios da atividade
30 inseticida de dsRNAs contra *Spodoptera frugiperda*.

A invenção descreve genes-alvo específicos e sequências de dsRNA causando atividade inseticida contra Lepidópteros *Spodoptera frugiperda* por interferência de RNA na expressão do gene alvo. O rompimento dos genes alvo pelas sequências de dsRNA pode ser amplamente inseticida em numerosas espécies. As sequências específicas de dsRNA mostram atividade inseticida sobre a ingestão e podem ser utilizadas com um modo de entrega de plantas transgênicas. A Tabela 1 apresenta o polinucleotídeo de exemplos não-limitantes da sequência alvo de *Spodoptera frugiperda*, uma breve descrição da função da proteína codificada pela sequência alvo, e uma SEQ ID NO. A Tabela 2 apresenta um resumo dos primers usados para suprimir os polinucleótidos alvo.

[illegible]

TATTTATTGTAACCACTGCCCCCTTAACCTCATCTATGAGTCACCCATAAAATGTTATTTGGTAAATGTTTGAC ACACTTCACACTAATATTTATAAATGTGAAGTTTGTGTTGTTGATGTTGTATATTTGTCTGCAATCACGCT GAAACCACTGTATAGAAATTTGACCTAATTTGGTATACANACAGGGTATGAGCTGACTTGGGTGATAGGATACITTT TTATCCACAGGAACGCGGGTAAAGTCCNTGGGCAGAAAGCTAGTATGTAATAATTATNTCCCTCTACCTACCCCTA TATGGGGTGGACCGTCATGTTCTTTACNCNACAACCNNGTTTGTCCACCTCNCCCTTTAAAGTTTTGTNAG	SEQ ID NO:5 >ise2c.pk009.i4 Investigação do hormônio juvenil GCACGAGGGCCGTGTCGACTTCGCACCCAGTCCCTCTATTTATTTACCTTGACAAAAATATGGCGCGCTATTGTTT ATTGCGCTATCCTGGCGTTGGCTATAATGCCAGTATACTTCTTATTCCTAAGGGACCCACCCACTACCCGAA CTAGATATGAACGAGTGGTGGGCCCCAGAGAAGCTAAAGCAAAACCTGACACTAGTATAAAACCCCTTTAAAATT GCTTTTGGAGACACTGTTGTAAAAGACTTAAAAGACCGTCTCAAACGTTCTCGGTCTTTCACTGCTCCGCTGGAG GGTGTGGCATTCAGTACGGCTTCAACACTGCTCAGCTGGATGGTTGGCTGAAGTACTGGGCTAATGAGTATAAG TTCAAGGAGAGAGACCTTCCTCAACCAGTACCTCAGTACAAACCAATATCCAGGGTCTTGACATCCACTTC ATCAGGGTTACACCGAAGGTACCGGAGGAGTGGAGTGGTACCCATGCTACTCTCCACGGCTGGCCAGGCTCT GTCAGGGAGTTCTACGAGGCTATTCCTCTCATCAGCAGTCAAGCAAGGACCGTGACTTCGCTGTGGAAGTCATC GTTCCAAGTCTACCTGGCTATGGATTCTCTGTATGCGCGAGTTCGTCCCGGChnnnnnnCCCCACAAATGnnn
SEQ ID NO:6 >ise2c.pk001.d19 Investigação vacuolar GCACGAGGCTTGACGTGATGTTACCTGGGAATTCACCCCTTGAATGTTAAGTTCGGCTCCACATCACCGGAG GAGACTTGACGGTATCGTACACGAGAACAACATTTGGTTAAGCACAAAGATGTTGATCCACCCCAAGGCCAAGGGTA CCGTCACTACGTCGCGCCCTCCGGCAACTACAAAGTCACTGACGTAGTGTGGAGACGGAGTTCGACGGCGGAGA AGGAGAAGTACACCATGTTGCAAGTATGGCCGGTGCAGCCGCGCCCGTCACTGAGAAGCTGTCCGCCAACC ACCCCTGCTCACCGGACAGAGTGTCTGACTCTCTCTTCCCTTGTCTCAGGGTGTACACGGCCATCCCCG GCGCCTTCGGTTGTGGCAAGACTGTGCTCACAGGCTCTGTCCAAGTACTCCAACCTCTGACGTCTATCTACG TCGGATGCGGTGAACGTGGTAACGAGATGTCTGAGGTACTCGGTGACTTCCCGAGCTGACGGTGGAGATCGAGG GCATGACCGAGTCCATCATGAAGCGTACCGCGCTCGTCGCCAACACCTCCAACATGCCTGTAGCCGCCCGAGAGG CTTCCATCTACACCGGTATCACCCCTCTCCGAGTACTTCCGTGACATGGGTACAACGTGTCCATGATGGCTGACT CCACCTCTCGTTGGGCGG	SEQ ID NO:7 >ise2c.pk001.e14 Investigação vacuolar GCACGAGGCAGATAGTCATCACTGTTTTTGGGACCTGTnnnTACTCCCTCAATAAACCTACAAAAATGGCCGAAAA CCCAATCTACGGACCCCTCTTTGGAGTTATGGGGGCGCGTCTGCTATCATCTTTAGCGCGCTGGGAGCTGCCTA

TGGAAGTCTAnGnChnnnACCGGTATCGCGCCCATGTCGGTGATGCGGCCCGAGCTCATGAAAGTCCAACAA CTACACCCCTTTACAAGnGGTTTCATCCACCTTGGCGTGGTCTnnCGTAAGTTTCTCCGGTCTAGCGnnnGGCnn	SEQ ID NO:8 >ise2c.pk001.f20 Investigação vacuolar GCACGAGGCTCACAGGCTCTGTCCAAAGTACTCCAACTCTGACGTCATCATCTACGTCGGATGCGGTGAACGTTGGT AACGAGATGTCAGGTACTGCGTGAAGTCTCCCGAGCTGACGGTGAGATCGAGGGCATGACCGAGTCCATCATG AAGCGTACCGCGCTGTCGCCAACACACTCCAAATGCCTGTAGCCGCCGAGAGGCTTCCATCTACACCGGTATC ACCCTCTCCGAGTACTTCCGTGACATGGGTTACAACGTTGCCATGATGGTGAATCCACTCTCGTTGGGCCGAG GCTCTTCGTGAGATCTCnnnnCGTCTGGCTGAGATGCTGCGACTCGGGTTACCCCGCTACCTGGGAGCCCGT CTGGCCTCGTTCTACGAGCGTCCCGGAGGTGACTTCTCCGACCCCGTACCGGCGCCACGCTGGGTATCGTGCAGGTG GTGGGCGCGGTGTCGCCGCCGCGGAGGTGACTTCTCCGACCCCGTACCGGCGCCACGCTGGGTATCGTGCAGGTG TTCTGGGGGTTGGACAAGAAGCTCGCGCAGCGCAAGCACTTCCCGCCATCAACTGGTCTATCTCTACAGCAAG TACATGCGAGCGCTGGACGACTTCTATGAGAAGAACTACCCCGAGTTCGTGCCCCCTCnnnnnCAAGGGTCAAGGA GATCCTGCAGnnn
SEQ ID NO:9 >ise2c.pk010.h3 Investigação da caderina GCACGAGGTACTAAACAGTGCCTGTAATATATCAAGATGTCTCGTCTTAGGTTTTGTTTTTATTAGCAGT ACTATGCAGTTGTTGCAGAAATGTTACGGTTTTACACAGAAAGCCAGTTACCCAGCATGTAGATCCTAAACC AGAAGTCTTGAACGTTGCCTGAACAACACAGAGTGCCTGCGCCGAGCTCGTCGACGGCAGCGCCGACCAACC AGTCCGACACCGGCACCAACGCCAGCACCCACACAGCTCCTACACCAAGCTCCTACTCCAGCTCCTACCCCTGC GCCTACTCCTGCGCCTACTCCTGCGCCTACTCCTGCGCCTACCCCGCACCTACACGAGCGCCCACTCCTGCTCC CACCCAGCTCCCTCCCGCCCGGACCAAGGCACATGGTCTTCACTGATGAAAGGCCAATCAGACATGCAT TGTGGCCCAATTCGACGCCCAACTGAATGTACATACACCAAGTTAGTGGAGAATGCAACGTCTCTATCGTACGT GAGGCTCAACGTGCCCGGACGCGTGGTCTCTCAACGGCAGCTGTTGCGACCCCGACCAATGGATCCAGATCAC CTGGAAGACCAACGACGACAGCGAGACGAACAACACCATGACCCCTCGTGTACAAACAAGAAATGCCACCAAGnn CTACGGCCTG	SEQ ID NO:10 >ise2c.pk011.a10 Proteína cuticular GCACGAGGCGGTTTGAAGTGATCTAGTTGTCAGAAAAAACACAGACCACGTTCACAATGAAATCGATGGTGGT GTTATTGCTGTGTGCGCGTGGCGTCCCTGTTGCGGCTGCGCAGCTCCTCATCACCCGCGCTCGT GCTGACCCGACGCGCGCGCTCGACACCGCGGAGGTGATCAACGCGCGCGCTCCACCTGCAGGCTAAGGC CCTGGATGGACACTACGCTCCCTCGCGCACGCTGCCGTGTCCTGTTGCCCACTCCGTGGTAGCCGCCCGCGC

TGTGGTCGCCGCTCCCGCCGCGTGTCCACAGTCCCGTGTGGATGTGCGCACAGCCCCGCCATCGTGAGCCA CGCCGTGCTGCTCCGTAAGTACCCACGGTGTCTACTCCGCTCCCTGCTGCGCCACTCCGCTCTCGGCTACGC CGGTACGGACACTACCTGAAGAAGCGTCCCTGGGACACCTCGCTACGCGCTCCGTCGTCGCCACGTAGC TCCCTCCGCGGTGTGCGACCAAGTCCCGGTGGnChnTCGTCTCCAGCCnnCTGTGCTCTCAAnnnnnTnnTnC CGTnnTGTCCCh	SEQ ID NO:11 >ise2c.pk011.h12 Proteína cuticular GCACGAGGGGACGTTGAACGAAAGAAATGCTACGCGTTACGATTTAGCCGACAGTGGTGTGCTCGCCTCAGGC GCGCCCCAGAACAACTTCATCTTCAAGATGACATCACTCTGAGGAAGCCAGCAGTACCTCAAACAACCTGCCG TTCACCTCACCCAGCTCTCTGGACGACCGCTGTACTGCCTCTGGTTCGCTACGACGACCCACAGTTTCGTTCA GCTGAAGCTGGCCCCAACCTTGGACACTACTGGAAGATGGACAGGAGATCCAGAACACAGAGGACTACTTAGAA GAGGTCTAACACGCGGCTCAATACCAGCCAGGACGCTCTGGCAACTACGCCCTACGGTTATGAGACCCCTGAA TCTTCCAAGGTTGAGAACCGTGAAGGTTCCGGAGTGTCCAAAGGATCCTATGTGTACCAAGTTCCCGGAATGAAG GATCTCGTChnGGTCCGTTACTGGGCTGACAGCCnnnnTTCCACCCAGnAnGACAAATCTTCCCAAGGTTGAACTG AnnnCCGCTnnnnnnnnCCCGCTCT
SEQ ID NO:12 >ise2c.pk001.d22 Fator de iniciação de tradução GCACGAGGTATCACTCCTGACCGTATCTAAAACTCGGCACACACAACAATGGCTGACATCGAAGATACACATTTTC GAGACCGGGGACTCCGGTGCCTCGCCACCTTCCCTATGCAATGCTCGGCCCTGCGCAAGAACGGTTTCGTCATG CTTAAGGGTCGCCCCTGCAAAATCGTCGAGATGTCCACTTCCAAAACCGGAAAGCACGGCCACGCTAAAGTTTCA TTGGTTGGAATCGATATTTTAACGGCAAGAAATACGAAGATATCTGCCCTTCCACCCACnnnCATGGACGTGCC CCACGTGAAGCGTGAGGACTACCGCTACCGGATATCTCTGACGACGGTACCTTACCCCTCATGGCTGACAAACGG CGATCTCCGCGAGGACCTCAAGATCCAGACGGTGACCTCGGCACCCAGTTGCGTTCTGACTTCGATAGCGGCAA AGAGCTGTTGTGCACTGTGCTGAAGTCTTGGCGGTGAGGAGTGTGTAATCGCAGTCAAGGCAACACAGCTCTCGA CAAATAAACCAACTCAGCATTTATAGGGATATACATACATATAATTTTTTACAATCAACAGCTCTTACATAAAT GTAAACATAATACTATGTATAATTTAACATnnnnnATTATGGTGTGACGCGGTGCTGGCTTGTGCGCGTCCACT CCACCCCCGAAG	SEQ ID NO:13 >ise2c.pk001.d9 Fator de iniciação de tradução GCACGAGCGCGGATTGTAACATGTGCTATTCCAGAGAAAGATCAGAAGATTGGCCGGAAGATTCCAAAAATG GCCCGTCTAAGGATCAAGGCAACTATGATGGCCCTCCAGGAATGGAACCCCAAGGGGCACCTTGATACAAACTGGC ACCAGGTCGTGGAAAGCTTTGACGACATGAATCTGAAGGAAGAATTGTGAGAGGAATTTATGCTTACGGTTTTG

CGAAGTTATTGACGATTTAGATCTAGATATTGACTTCTCTAAACGAAAAAGAAAGAAACATnnn AnGAGCTCGTCTTGAAGATGACACCAAGGAGAAAGATCAAGAGAATGTCGAGGATGTTAGTGGTATTATGGA GCGGCACAGACCGTGACTACAGTACGACGAGCTACTAGAGCGAGTGTTCGACATCATGCGAGAAAGAnnnnA GCATGGTTT	SEQ ID NO:17 >ise2c.pk002.m10 SARI GCACGAGGCAGATTCCATCGCTTATTCGTTGCTGAGAAAAATCGTCGGTTTTAGCGACGTAAACATATT GCTAATAAGTGTGAATATTGTGATAAACTTCCTTTTAGCATTAGTTAATCTAGTTCAATTTTAAATAATTCAAA ATGTTTATCTTGGATTGGTTCACTGGTGTCTCGGATTCCTGGTGTGGAAGAAATCAGGCAAGCTACTGTTT CTGGGACTGGACAATGCTGGCAAGACACACTCTGCACATGCTGAAGGATGACAGATTGGCGCAGCATGTACCC ACATTGCATCCACGTCGGAGGAACGTCAATAGGCAGTATCGTTTCACGACGTTTCGACTTGGCGGGCATCAG CAGGCGCGGCGGTGTGGCGCGACTACTTCCCGCGGTGGACGCCATCGTGTTCCTGTGGACGCGTGCACCGC CCGCGCTGCCCGAGTCCAAGCCGAGCTGGACTCGTCTCACTGACGAGACGCTCAGCnnACTGCCCGTGTCT CATCCTCGGCAACAAGATCGACAAGCCCGCGCAGCTAGTGAGGACGAGCTCCGTCAGTCTTCAACCTGTACCA ACAGACCACTGGAnGnCAAAGTATCnAGnTCAnnnnT
SEQ ID NO:18 >ise2c.pk001.c14 Fator de Alongamento GCACGAGGGTCTATCTCGGATATTACACGTGGATTGTATCCGTGACTAACCAAAAATGGCAAGGAAAAAGnnnC ACATTAACATTGTCGTATTGGACACGTCGACTCCGGCAAGTCCACCACCGGTCACTTGATCTACAAATGCG GTGGTATCGACAAACGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGnnnCCCAGGAATGGGGTAAGGGTTCCTTCAAAATAC GCCTGGGTATTGGACAAACTGAAGGCTGAGCGTGAACGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTGTGGAAGTTCGAA ACCGCTAAATACTATGTACCATCATTTGACGCTCCCGGACACAGAGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGAAC TCCCAGGCTGATTGGCGCGTACTATTGTGCGCGTGGTACCGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCGAAGAACGGA CAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCTTTCACACTCGGTGTCAAGCAGCTGATTGTGGGCGTCAACAAAAATGGAC TCCACTGAGCCCCCATACAGCGAATCCCGTTTCGAGGAAATCnnnnnnn	SEQ ID NO:19 >ise2c.pk001.d16 Fator de Alongamento GCACGAGGCGGATATTACACGTGGATTGTATCCGTGACTAACCAAAAATGGCAAGGAAAAAGnTTCACATTAAAC ATTGTCGTATTGGACACGTCGACTCCGGCAAGTCCACCACCGGTCACTTGATCTACAAATGCGGTGGTATC GAnnnACGTACCATnnnnn

SEQ ID NO:20 >ise2c.pk001.j9 Miosina GCACGAGGCTCTAGTCCCGTCACCGTCGCCAGTAGGGGGGCCACAGAAGAGAAATTTATTTCAAACCTCC AATTATAACCTACTAGATAACTCCAAAAGTTCTGTACAGTTCTAACTTTAATTTAACGGGACGTCAGAGTTTATG GATAGGACCGATAAGATAAATATCGGACGCGACTGAGCTACAAGCAATGCAGAACTTTATCATGGAGAAGATTAC GAAATGGAACCTAATGAGAAGAAGAACTCTGAGGTCGACAGGGTATTCAAACACGCAATTATTAGAATTCAA GACAATTTAGTAGCGACGTACAGCATAGTGGAGACGCGGGCTCTGCGCTGAAGTACAAGGATCTGATCGGCAAC TTCCTGCACGTCATGGAGACGGTTTGTGCCAGGGAGGGTCCACGCTCTCCATCACCATGGGGTCAACGCCCTTT AGGGGTTTCATGGACGAGTTTATGAGCCAACTGACACTGATAAAGCTAGGACGnnnnGnnnAAGGATAAAAAGA nnnnnnTGGACGATCCAATAACAATAAGGCCATACGTTTCATACTGTCATGATCAACATACCAAnnnnAGTGT GAGATCTGCAAGACTTTCTTCATGTGGCCCATAGAGCGGTCACTCATATGCCAGACGTGTAAACTTGCCTCGCAT AAnnnTnnnACACTA	SEQ ID NO:21 >ise2c.pk001.b14 Transportador de aminoácido no canal de potássio TGACTCCACAGTGGGACAAACTCATAGAGCTTGATGTGGTACGCTGCTGTGACCCCAAGTGTCTTCTCTCTGT CTGTGTGCACCGGTGCCATCATTATGTTCTCGTCTACAATGGATTACAGACAAAATGTTTACAGAGACGCGATGA TTGTCACTACTTTGGACACCTTCACCAGTTTGTATCCGGTTTCACGATCTTCGGTATCCTGGTAACTTGGOGT ACGAGTTGGACAAAGATGTGGATGACGTCACTGGTTCTGCAGGAACCTGGACTTGCCCTTCATTTTCATACCCCTGACG CGATCTCCAAAACCTTCCAGCCACAGTTGTTCCGAGTGTCTTCTTGTATGATGACGGTACTAGGTATCGGAT CAGCAGTTGCTTTACTTCCACCATCAACACCGTGATGATGGACGGTCCCTCGCATCAAGACCATCTACAIGT CCGCCCTCTGCTGCATATTGGATTGCCATCGGTCATTTACGTCAACCTGGTGGCCAAATATATCTCGAGC TGGTGGATTACTTCGGTGAACCTTCTGATTTCTTCTGTGCTATCGCTGAAATATTGGTGTATTCTGGATT ACGGCTTGAGnnnTATGCCCTGGATATTGAGTACATGTTGGGAGTTAAACTTCTTCTACTGGnnnTnnTGTGGG GCGTTATTATGCCTGCCATGATGATnACCGnnnnnn	SEQ ID NO:22 >ise2c.pk003.f2 Retificador de potássio internamente GCACGAGGGTAAACAGATTTTAACACTACATTAAATTTGTTCTAGAGTTAAATGTATTAAATCCGACTTAAAAACA GTGCTTGTGATAAGTGAACACAAATTATTGAGCAATGACTGACTTTATAAAACAATATTTCAAGGAACAATATGA AATAAATGAAAAAATGCTTTTCGAAAATTGACGCGGATCTGCGAACCTGCGGAGCACACTTAGTAGAGTGAAGTT AATGGTGACTGCCCTCGAGTTGAAAATGACTTCGATGAAGACAATGTATCAGGATCTAATGGAACCTCAGAGAAAT AATCGTTCTTTAAATCCACACTTGAAGAAACCGAGATAATAATAACAATACAGTAAGGTTAACGAATACTATCTT TTAATTTCCCTTAAATTATGTTCATAAAAATGATTAAGTTGTTTACGTGAACACAGTGGTGTACTGACAGGATAGG TTTCATTAACCTTGCATAATCGATCAGAAAACCGTGTCTTTCTTTTGTACTCGACCATTCAATAAAGCGAT
---	--	---

GACCCCATAGGATTnnnTGGGTGGTGTAGCTCGACTTCGCTTGGACAGGCTGACCAAGTTGATTCTATAGTGCCT TCAAACTACGAnnATTTCCATAT	SEQ ID NO:23 >ise2c.pk005.i20 Transportador de aminoácido GCACGAGGATTTCTTAAACGGTACTGCAGCAAAAAGACGGCATTGAAGGTGGACTCGGCTGCCTATCTGGTA CCTGGTGGTTTGTCTGTTCCGGTCAATGTTTATCATCTTCGTGATTGTGCCGAGGTGTAAGAGTTCGGGTAA AGCTGCATATCTTGGCTCTCTCCCTACGTTGTGATGCTCATTTTGCTTAAAGACCTCTATTCTGCCCGG AGCCGGCACCGGCAATCTTTCTCCTGACTCCACAGTGGGACAACTCATAGAGCTTGATGTGTGACGCTGC CGTGACCCCAAGTGTCTCTCTGCTGTGTGACACCGTGCCATCATTTATGTTCTCGTCTACAATGGATTCAAG ACAAAATGTTTACAGAGACGCGATGATTGTCACTACTTTGGACACCTTCACCAAGTTTGTATCCGGTTTCAAGAT CTTnnTATCCThnnTAACTTG
SEQ ID NO:24 >ise2c.pk001.d1 Tubulina GCACGAGCCGGTCTTCAGGGCTTCCTTATCTTCCACTCCTTCGGTGGAGTACTGGATCTGGTTTCACTTCCCT CCTGATGGAGCGACTCTCCGTGGACTACGGCAAGTCCAAGCTGGAGTTGCCATCTACCCGGCGCTCAGGT GTCCACCGCTGTGAGCCCTACAACCTCCATCCTCACACCCACACCAACCTTGAACACTCCGACTGCGCTT CATGGTCGACAACGAGGCCATCTACGACATCTGCCCGCAACCTCGACATCGAGCGCCACGTCACCAACCT GAACCGTCTCATCGGGCAGATCGTGTCTCCATCACGGCTCCTCGCTTCGACGGCGCTCAACGTGATCT TACCGAGTCCAGACCACTTGGTGCCCTACCCCGTATCCACTCCCTCTGTGTCACATACGCCCGGTCATCTC TGCCGAGAAGCGGTACCACGAGCAGTGTGCGTGGCTGAAATCACCAACGCAATGCTCGAGCCCGCAACCCAGAT GGTCAAGTGCAGCCCTCGTCAAGGCAAGTACATGGCTnnnTGCATGTTGTACCGTGGTGACGTCGTCCTCCCAAGG ACGTGAACGCCGCCATCGCCACCATCAAGACCAAGCGTACCATCCAGnnnCGTnnnTGGTGTCCnnCnnnGThn n	SEQ ID NO:25 >ise2c.pk001.k6 Tubulina GCACGAGGATTCGTTTGGCAAGCCTCTTAACCGGTGCGCTGAACGACGACTGATAATTAATTAATTAATTTCT ACGTTAAGTTCAACAAACTCAATTCAAATGCGTGAGTGATCTCAGTACACGTTGGACAAGCCGGAGTCCAGA TCGGTAATGCTGCTGGGAATTATATGCTTGAACATGGAATCCAGCTGACGGCCAGATGCCACAGACAAGA CCGTGGCGGTGGTGTGATGACTCTTCAACACCTTCTTACGAGACCGGTGCCGCAAGCACGTCCTCCAGGGCTG TGTTTGTGACTTGAACCCACAGTAGTTGATGAGGTCCGCACTGGCAGATACAGACAGTTGTTTTCATCCAGAAC AACTTATCACTGTGAAGGAAGATCGGGCCAACTACGCCGTGGTCACTACACCATCGGCAAGGAATCGTAG ACCTAGTCTCGACCGCATCCGTAAGCTCGCCGACCGTGCACCGGTCTCCAGGGCTTCCTTATCTTCCACnnnn

nTCGGTGnnnnACTGGGATCTGGTTTCACCTCCCTCCTGATGGAGCGACTCTCCGTGGACTACGGCAAGAAgTn nAAGCTGGAGTTCGCCATCTnnCnGnnCTCnnnnTnnnnnnCTGTC	SEQ ID NO:26 >ise2c.pk001.i2 Tubulina TTCGGCACGAGGGGCAAGCCTCTTAACCGGTGCGCTGAACGACGACTGATATTTAATTAATTTATATTCTACGT TAAGTTCAACAATACTCAATTCAAAATGCGTGAGTGATCTCAGTACACGTTGGACAAGCCGGAGTCCAGATCGG TAATGCCTGCTGGGAATTATTTGCCCTTGAGCATGGAATCCAGCCTGATGGCCAGATGCCACAGACAAGACCGT GGCGGTGGTGATGACTCCTTCAACACCTTCTTCAGCGAGACCGGTGCCGGAAGCAGTCCCGAGGCTGCCAGGCTGTGT TGTTGACTTGGAAACCCACAGTAGTTGATGAGGTCCGCACTGGCACATACAGACAGTTGTTTCATCCAGAACAAC TATCACTGGTAAGGAAGATGCGGCCAACAACTACGCCGTGTCACCTACACCATCGCAAGGAAATCGTAGACCT AGTCCTGACCGCATCCGTAAGCTCGCCGACCAAGTGACCGGTCTCCAGGGCTTCTTATCTTCCACTCCnnCn GTGGAGnTnnTGGATCTGGTTTCACTTCCCTCCTGATGGAGCGACTCTCCGTGGACTACGGCAAGAAgTnnAAG CTGGAGTTCGCCATCTAnnnn
SEQ ID NO:27 >ise2c.pk002.b4 Ubiquitina GCACGAGGATCAAAAGAGTTACGAACCGTACCATACTGAAGGAGATACCAATTCGTGTCGCCATTCTCAACACGGG TCCTTATATTCGAAGGACTTTAGCGAGAGAGAAGCAGCACCTGGTACGAAATGACGAACCTTCAACGAGGGGC CCTCGATCAACATCAGTGTTCGAAGGACGCAATTTATGAAGATGCATTTGATAAACCTAGTCCGGATAATGAAC CTGATTTGAAGTTGAACTTCGCGTGCAACTGATCAACGAGCCGTCGCGAGGAACTGGTGTGACGGCGGTG GACTATCCGAGAGTTCTTTCTGAGCTCTTAAATCTGCATTTGATCCGAACAGGGGTCTGTTCCGGCTGACAA TAGACAACATGTTGTATCCGAACCCCGCGTACATCTACTGATGATGATCCCCATGCATCTACTCTCGTCG GCAGGATGCTGGGAAAGCGATGTACGAGAACCTGTTGTTGAGCTGCCGCTGGCGGAGTTCTTCTCTGGGCAAGC TGTGCGGCTGCGGGGAGGCCGACGTGCACGCGCTGGCTCGCTGACCCCGCGCTGCACCGCGGTGTTACTAC TC	SEQ ID NO:28 >ise2c.pk001.j16 Ribonucleoproteína nuclear pequeña GCACGAGGCGCGCGCGTGTTCGTGCCGTCCCGCCGGCCGCGGCGCTACTGGCCCGCGACCTGCTGGCGCTG GCCGCGCGCACGCGCAGCCCGCGCTTCTGCGCGCGCGCCGACGTGCTGCAGCCCTTCTCAAGAGGATC AACGACAAGATGCTGAAGGAGACGGTGGCTGCGGGCGTGGCGTACCTGCACGAGGCGTGGACCCGCGGAnngG CGCCTGGTGCAACAACTGCTGAGTGGGCGCGCTGGCGTCTGCGTGGCGCGCGAGCTGGCCTGGGCGACT SEQ ID NO:29

>ise2c.pk006.h23
Ribonucleoproteína nuclear pequeña
GCACGAGCGAAGATAAAGGTCGCGTGTGGACCTTAGGTTTAAAGTTTATTAAATAATTTAGCCTAAACATAA
GTCATGGCCAATAACGACAACCTTGCACAAGATGTTACTGATAATCAACTAAATGGAATGCCGAAATGGTGGT
GGCGATACGCAAGAACATAATAGTCCGAAGCCCTGGCGTGATGATGACAGAAAACCTTTTGTGGAGGCCTG
AGCTGGAAACCACAGACAAGGAGTTACGTGACCACTTCAGTGCATATGGTGAGATTGAGAGCATCAATGTC AAG
ACTGATCCAAACACTGGCAGATCAAGAGGATTGCCCTTATTGTGTTCAAGGCCACGAGTTCAATAGACAAAGTG
ATGGCTGCTGGAGAGCACACTATTAAACAACAAAAAGTTGATCCGAAAAAGCAAGGCTAGACATGGAAAGATC
TTTGTGGTGGTCTTAGCAGTGAATATCAGATGATGAGATCAAAAACCTTCTCAGTAATTTTGGAAACAATAAT
GAAGTCGAGATGCCCTTTGACAAAAACCAAGAAATCAGnnAAGGATTCTGCTTTATAACATTGAGTCTGAACAG
GTGCTCAATGAGCTGCTGAnnnCn

SEQ ID NO:30
>ise2c.pk006.m8
GCACGAGCGCGTGTGGACCTTAGGTTTAAAGTTTATTAAATAATTTAGCCTAAACATAAGTCATGGCCAA¹⁷A
ACGACAACCTTGCACAAGATGTTACTGATAATCAACTAAATGGAAATGCCGAAATGGTGGCGATACGCAAG
AACAATAAGTGCCGAAGCCCTGGCGTGATGATGACAGAAAACCTTTTGTGGAGGCCTGAGCTGGGAA¹CCA
CAGACAAGGAGTTACGTGACCACCTTCAGTGCATATGGTGAGATTGAGAGCATCAATGTCAAGACTGATCCAAACA
CTGGCAGATCAAGAGGATTTGCCCTTATTGTGTTCAAGGCCACGAGATTCAATAGACAAAGTGATGGCTGGAG
AGCACACTATTAAACAACAAAAAGTTGATCCGAAAAAGCAAGGCTAGACATGGAAGATCTTTGTTGGTGGTC
TTAGCAGTGAATATCAGATGATGAGATCAAAAACCTTCTCAGTAATTTTGAACAATAATTGAAGTCGAGATGC
CCTTTGACAAAAACTAAGAATCAGAGGAAGGATTCTGCTTTATAACATTGAGTCTGAACAGGTGGTCAATGAGC
TGCTGAnGACTCCTAAGCAGnnnATTGGTGGCAnnnnnnnCGAC

SEQ ID NO:31
>ise2c.pk001.a23
GCACGAGGATGAAGTTGGCTCTGACACTCTTGGCTCTGGCGGGGTGGCCACCGCTAAAAACATCAACGTCGAGG
ATGCCATCGACCTAGAGGACATCACCGCCTACGGATACCTGGCTAAGATCGGTAACCTCTTGCCGACGAAATCC
GCAAAGCTGAGGAGGCAGAGCGCATCCAGAATTGTTGGTGCAGGCTCCAGCCTCGGACAGTCCCTACC
AGCTGGTCTTCTCGTGACTTCTCCGCTGGCCAAAGGTGTGTGGTGTTCTTGGTGGTGCCAAACCGTGTT
TTACTGCTGCTACTGTTTCGATGGCCAGAACCCAGGCTGGAGATTACCGTTGTTCTTGGCTCCATCCGTT
TGTTCTCCGGTGTACAGAGTTCAACCTCCAAGTTGTTATGATGGAAGCTGGAACCCAGTAACATCCGTA
ATGACGTCGCCATGATCAGGCTGAACCTCAACGTTGGTCTTTCAAAACACCATTGCACTCATGCTCTGCCAGCG
GTAGCCAGCTCAACGAAACTTCGCCGGTGAACACGCCGTGCnnnCTGGATTCCG

SEQ ID NO:32

>ise2c.pk001.a7
 GCACGAGGATCAAAATGAAACTGTTCTCGCAGTCGTGTGCTTGCCCGTTGCCGCATCCGCGTGGAGATTGGAG
 TTCCGTCTCAGGAAACCCAGTCTTTGGCTACCATCAAAACTTCGGTATTGCCGAAGTCCAGGATCAAGAAGG
 CTGAGGAAGAAACCCAGCCCTAGCGCCAGAGGATCGTCGGAGATCTGTCACTGACATTTCCAACGTCCCTTACC
 AGGCTGGTCTCGTGATCCAAGTTTGGTCATCTTCCAATCCGTGTGGGTGGTTCCATCATCTCCACAAACCCGCA
 TCGTGACCGCTGCTCACTGCAACTGGGACGGTTCTATACCGCTAACTCTTTACCCGTGCTACTGGCTCCAACT
 TCCTTTCTCCGGGGTAACCGCATCACCAACAGAGATGTGTATGACCCCAACTGGACCCCAACCAACCGCTG
 CCAACGACATTGCTGTCTCCGCATTAGCTCCGTTACTTTACCAACGTGATCCAGCCCATCGCTCTGCCCA3CG
 GCAACGAGCTCAACAACGACTTCGTCAACTGGAACGCTATCGTTCGGATACGGTCTTACCGCTGATGGTGCTA
 ACATCGGTACTACCCAACGTGTAGCTCCGTGGTACTCCCGGTGATCnnnnnnCGCCAGnnCGCTACCGTnnnnn
 n

SEQ ID NO:33
 >ise2c.pk004.c4
 GCACGAGGAATCTTAGTTACATTGGAGTGACTTTTATTTATCAATAACATTTTATTTGAAGACTCAGTACGTAT
 TATCGCGTAGTTCAACAGAGTTGCTAGTGTAGTTTCTGAAAGTTGCCATCTTGCTTTTGCAACTTTTAAATATA
 AAAGTCTTATTAGATCGTTTTTACTACCGATAAATTTACTAAAATATAAAGTGCAATTTACAATTACTCTGTT
 AGTGTCAAGTTTGTGGAATTTGTCGTAGTTATAAAGGACACTGTATTGATTTTGTCAATCAGTTTGACGCATGC
 GCTCATTTGGTGCCGTAAAAAAGGGTTGGCCAACTTCGGAACAGTGTGTTCCGGTCGCCGTTGTGCGTGGTGTG
 GGTGAAGTTAGTGGTGAATTTTACGTGTATAACATCAAAAAATGGCGTCTGGTGTGACAGTTTCGGACGCGTG
 CAAAACGACGTACGAGGAGATTAAAGAAAGACAAGAACGCCGCTACGTGGTGTCTACATCAGGGATGAGAPACA
 AATTGACGTAGAGACCGTCGGCGAACGTAAACGCGGAATACGATCAGTTCCTTGAGGATCTGCAGnnnGGTGGCAC
 CGGnnAGTGcn

SEQ ID NO:34
 >ise2c.pk004.l4
 GCACGAGGCTGATATCTAATCTTAGTTACATTGGATTGACTTTTATTTATCAATAACATTTTATTTGAAGACTC
 AGTACGTATTATCGCGTAGTTCAACGGAGTTGCTAGTGTAGTTTCTGAAAGTTGCCATCTTGCTTTTGCAACTT
 TTAATATAAAGTCTTATTAGATCGTTTTTACTACCGATAAATTTATCAAAAATATAAAGTGCAATTTACAAT
 TACTCTGTTAGTGTGAGTTGTGGAATTTGTCTTAGTTATAAAGGACACTGTATTGATTTGTGCAATCAGTTT
 GACGCATGCGCTCATTTGGTGCCGTAAAAAGGGTTGGCCAACTTCGGAACAGTGTGTTCCGGTCGCCGTTGT
 CGTGGTGTCCGTGAAGTTAGTGTGGAATTTTACGTGTATAACATCAAAAAATGGCGTCTGGTGTGACAGTTTC
 GGACGCGTCAAAACGACGTACGAGGAGATTAAAGAAAGACAAGAAAGnnCCGCTACGTGGTGTCTACATCAGGG
 ATGAGAAACAAATTGACGTAGAGACCGTCGGCGAACGTAAACGCGGAATACGATCAGTTCTTGAGGATCTGCAGA
 AGGGTGGCACCCGGAGAGTGCAGATATGGCCTCTTCGACTTCGAGTACACGCCACCGTCCCAAGGCACGTCGnnn

SEQ ID NO:38 >ise2c.pk001.c18 TGCTGCTGCTGGAAGCTGGGCCCAACCTCCGAGGAGAGCATTATACCAGGCTTAAGACAAACCTTGAAAGAAA CGCCTACGACTGGAACCTCACCAACCATTTGACGACGGGTACGAGCCAGCGCTGGCGGCCACGTGCAGAGAC AGCCGGGGGCAAGATGCTGGCGGCAGCGCTCGCTCAACGACATGGTGTACGCGCGGGGCCACCCCGAGGACT ACTACGAGTGGGCCGACATCGCCGGCGACGCTGGAACCTGGACCAACGTGCTGGACTACTTCAAGCGGACGGAGC ACATGACGGACGCCAATATCGTTCAACAAnnnnAGCTCATGCAGTACCACGGCACGGnnnnnnCCATnnnnnnT nnnGnnnCCAnTnnnnnnnn	SEQ ID NO:39 >ise2c.pk004.p1 GCACGAGGGGAAACATGGGAAGGAGGTGCGCATCAAGATGTTAGTGTGACTGGAACCTGCAACCTGATACCCAGAACTTCTACGC CGACTGCAAGACAGCCGCAAGAAGTTGCTTGTGGACTACTTCCATACAAACCTGCATACCCAGAACTTCTACGC GTTCCGCTTCTTTATCTGCGAAGTGTGAACCTCATCAACGTGCGGGCCAGATCTTCTTCATGGACTTTTCCCT GGACGGCGAGTTCTCCACGTACGGCAGTGACGTGGTCAGTTTCAACGAGATGGAGCCCGAGGAGCGTGTGGACCC GATGGCTAGAGTGTCCCGAAAGTGACCAAGTGCACTTCCACAAATACGGTCTTCAAGGAACCGTGCAGAAAGTT CGACGGTCTGTGCTGCTGCCATTGAACATCGTCAATGAAAGATCTACGTGTTCTCCTGTGTTCTGTTTATGAT CCTGTGCATCCTGAGTGGAAATTCGCTGATTTACCGCATGGCGGTGGTGGACCGCGCGTGGCGCTGTACCT GCTGCGTGGCGCAGCCGCTGGCCCCGChnnCGChnnnnGnnnn	SEQ ID NO:40 >ise2c.pk005.p13 GCACGAGGATTTAATAGCTATTATGACTTTACAGACTAGACGGATCAAGGCCATGCCCTCGCTTGCATACICA CCATCCGCACATACCGTATTGCGGTATGTCAATAAGTTGCAAATAATGTCTGTTCAAGTTTACAAGGATAAGATC AGCAGTATTGCGAACTGTACCTACTACTAAGCTGATAATGTAATAATTAACCTTTATTATTGAAATAGATATGT ATAATTGACATCTTTCTCAAATGGGTGTCATACTGCCAACTCTATTACCACAAATTTCTTTTCGTTATTGCTTTT ATACTGAGCCTGATGACGTACTGTACTTTTATTAGAAATTTAATTTTCTTACTACGTAGTCATTA AATCTGAGAAATTAATAATTAATAATTTAGAACTCCCAATTTCTGAATGAGGTTCTAATAAGTTGTTAGGAATAC TAAATACCAATTTACCAACATAAATCTAATTTTCGTTACTTAAATATTAAATGATAATGAATGICTATGATAA GTGTTTACTATCTTTATATCGACAAATTTATTTCCATGTTTTAAATTTATTTTCAGATGTTTTGACGTGAT AAGTTTGATTTTATCAATATCTGATAGTCGAGAGTTAmnAnTATTG	SEQ ID NO:41 >ise2c.pk001.f12 GCACGAGGGGAGAGAGGTGGTGGCTTCCTTGCAAAACGAAGCGTCGTAATTACATCTTATTTGTAAATTTT
--	---	---	---

TATCCAACGGAGTTGGAGTCTCAATTGCTAATGCGTTTACCTGAGGAGCCTGCAAAAGTTTTGAGAGAAAGTGTG
 AAATCCGGAGAGAACCTGAAAAACAGACTGACGATACAAATAGAAAACGACATGCGCACGGCGGAGGTAAAGTTTT
 GATCACTGGTTGATGACGCCAAGATCGTGATCTACCAACCATCATAGAACTCTAAAAACGATCGACAACAAG
 AGTTTCTACAAAACAGCAGATATATGCCAATGATGATTTGTAAGAAGAACCTGACCAACCATCCACAGAGGAA
 GAGTACCAGCTAAAAATAAGAAAAAAGATCCATACAAAGTTGACAAAAGTTCTATGGCCACACGGCATCACA
 CCGCCTACGAAGAAGTACGGAAGCGTCGATTTAGAAAAACCCCTTAAAAAGAAATATGTAGAAGCACCCAGAAATT
 GAAAAGGAAGTGAAGAGGCTGCTGAGnGCAnnCnATGAGGCTGTTAGTGTAACTGGGAGGTTCATCAAnnnnnnn
 GAT

SEQ ID NO:48

>ise2c.pk006.k12

GCACGAGGGTCGAATGGAACATGGCGGTGCTAGGCAGGATGTGCATAAGTTTTGATTTTGCATTTTAAACGAG
 TTGCTTATATCAGTTAGCTTCTAAATAATTTCTGACTTATTTCTGTGTTATAATATTTGTTATAGTGTAAGAAG
 CTTATCCACCCAGGAATTCCTATCTGGACTTACTTAGTTCTGCAATGAAAAATTATTTCGTTGGTAGTGTA
 AAATAATTGTGACAAATATATCATTGCTTCAGTGTCCGTGGTCATGGCTACGCTCCTCCAAGAGAATGG
 TATAAGGAGTTAAGCAAAGTTGTGCCTAACCGTGGTATATCCTCACATAGTGAACAATCATATGGTGCCTGA
 TCATGAATATTGCGAAGCTGGTCAACTAGCAGTCACAGATGAAGTACCGATACAAGTGAGGCGATGGCGCC
 ACCCGCCCATTTGAAGAAGAGGAGGATACACCAGAAATAGATATAATGATAACAATGTTGTGCGAGTTT¹AG
 TGTTAAGTGCCACCTGAACCTTAGACAGATAGCATnnnTGGTGTGAACGTTGAATTTCCGCCGAGAACGGCAT
 GGTAACATGAAGTTACGGCGTCCATACACTACTGCGTCCATCTGGTCGTCGCCGCGTGACGTGCACTGGTGC
 AACCAGCG

SEQ ID NO:49

>ise2c.pk010.i8

GCACGAGGGAATATTGCGAAGCTGGGTCAACTAGCACGTACAGATGAAGTGTACCGATACAAGTGAGGCGATGG
 CGCACCCCGCCCATTTGAAGAAGAGGAGGATACACCAGAAATAGATATAATGATAACAATGTTGTGCGAGTT
 TTAGTGTTAAGTGCCACCTGAACCTTAGACAGATAGCATTAAATGGTGTGAACGTTGAATTTCCGCCGAGAACG
 GCATGGTAACTATGAAGTTACGGCGTCCATACACTACTGCTCCATCTGGTCGTCGCCGCGTGACGTGCACTG
 GTGCAACCAAGGAGGACCGGGAAGGTTGCCGACGACGATGCGCGCCCTTCAGAAGCTCGGCTTCCAAG
 TGCCTTCCGCAATTTCCGTGTAGTCAATGATTAGGCACCTGTCCGATGCCGTTGGTATAAGGATCATATCTT
 TTTCGAAAAAATACAAGGAAGCAGACTATGAACCTGAGCTCCATCCTGGAGTCACATATAAGTTATACAATCC¹TA
 AAGCCACACTCAAGATATTCTCCACTGGTGTGACTATCACAGCTCGGAGTGTGAGTGACGTTCAAGTCAGTCAGCCG
 TGGAACGCATCTTCCCTTTGnTGTACGAGTTCGCGAAGCCTCnnnACCGGCAnnnA

SEQ ID NO:50

>ise2c.pk010.b12

GCACGAGGGTACCAAAAGCTCTTTTCATTGCAGCTGAAGGGTCACTGCAACTTGGCCCAATCAGAAATTAGCATTGA
AACTATTCAAAGAACTAAACAAGGAATGGAATCAGGCAACATTTCTATTGGCCTTTGTTAGTTCAGAAAGG
CAAAGGAAAATGATGAGGAAGGCCTCTTGCAAAATTTTAAAGAAATGAGCAGCAATGACTTTACTGTTACTGGAG
AAGCGTTAAGAGACTATGTTATCCCTTACTTGATAAAAAAAGATTCTCCACAGAAATGTCTTAACTTCAAA
TTGCAAATGTACCAACAATCCATGCTGCAAGAAATCTAATGGTTGATCTTTTGGATTCTGGAGACATAAAAGGCG
CAGCGGAAATAGCTCTGCAATATAGACCTTGGGGCAACTACTCTCTTGTGGCAGGTCCCTCATCAATGCAGTGA
ATAAGACAAAAGATGTAGATCGTTTGCTAAAATCTTCATGCTATAAGCAGTAAACCTTTGTGCACAGGGTGAAG
AAGATGTTGCTGCCAACAAATGAGGAAGGTCAAAGTGATGAAAATAATGATATTCATGAAGTCGGCCGTATTGTGA
GGTCGTCTGCCAAGAGTTTGGCTAAACCAGACTTAATAGnAmmnnTTTAGA

Tabela 2 Lista dos primers de dsRNA. (Nota: a sequência senso do primer de RNA e as sequência antisenso do primer de RNA mostradas na tabela 2 foram geradas com 2 resíduos de timina na extremidade 3')

Primer #	ID Gene Alvo	Seq ID	Alvo	Fita senso	Fita Anti-senso	SEQ ID NO Alvo/senso/antisenso
0075	Hormônio juvenil quinase diol	ise1c.pk002.m13	AACATGGTATCCGACTTCA GGAA	CAUGGUAUCCGACUUCAGG	CCUGAAAGUCGGGAUAC CAUG	51/52/53
0076	Hormônio juvenil quinase diol	ise1c.pk002.m13	AAGTGCCTGACGAGAAC AAGGA	GGUCGCUGACGAGAACAAAG	CUUGUUCUCGUCAGC GACC	54/55/56
0077	Hormônio juvenil quinase diol	ise1c.pk002.m13	AAGTGTCTCTGGGCTTGAGT TCCA	GUGUCCUGGGCUUGAGUUC	GAACUC AAGCCCAGG ACAC	57/58/59
0078	Hormônio juvenil quinase diol	ise1c.pk003.f7	AAGAAGAAGCTCCTCCAC GTGTT	GAAGAAGCUCCUCCACGUG	CAGUGGAGGAGCUU CUUC	60/61/62
0079	Hormônio juvenil quinase diol	ise1c.pk003.f7	AAGTGCCTGACGAGAAC AAGGA	GGUCGCUGACGAGAACAAAG	CUUGUUCUCGUCAGC GACC	63/64/65
0080	Hormônio juvenil quinase diol	ise1c.pk003.f7	AATGTCTCTGGGCTTGAGTT TCAA	UGUCCUGGGGCUUGAGUUC	GAAACUCAGCCCCAG GACA	66/67/68
0081	Hormônio juvenil quinase diol	ise1c.pk005.a15	AAGAATAAGCTCCTCCACG TGTT	GAUAAGCUCCUCCACGUG	CACGUGGAGGAGCUU AUUC	69/70/71
0082	Hormônio juvenil quinase diol	ise1c.pk005.a15	AATTGTGAGGAGAGACCCT ATTG	UUUUGUCGAGGAGACCCUAU	AUAGGCUCCUCCUGA CAAA	72/73/74
0083	Hormônio juvenil quinase diol	ise1c.pk005.a15	AAGTTCGCGTTCACCTCTTG AAGA	GUUCGCGUUCACUCUUGAA	UUCAAGAGUGAACGC GAAC	75/76/77
0084	Proteína ribossomal L18a	ise1c.pk006.d24	AAC TGCCCCCTTAACCTCAT CTAT	CUGCCCCUUAACCCUCAUCU	AGAUGAGGUUAAGGG GCAG	78/79/80
0085	Proteína ribossomal L18a	ise1c.pk006.d24	AATCACGCTGAAACCACTG TATA	UCACGCUGAAACCCACUGUA	UACAGUGGUUUCAGC GUGA	81/82/83
0086	Epóxido hidrolase	ise2c.pk009.i4	AAAAATATGGCGCGCCTATT GTTT	AAUAUGGCGCGCCUAUUGU	ACAAUAGGCGCGCCA UAUU	84/85/86
0087	Epóxido hidrolase	ise2c.pk009.i4	AACGTTCTCGGTCTTTTAC TGCT	CGUUCUCGGUCUUUCACUG	CAGUGAAAGACCCGAG AACG	87/88/89
0088	Epóxido hidrolase	ise2c.pk009.i4	AAGTCATCGTTTCCAAGTCT ACCT	GUCAUCGUUCCAAGUCUAC	GUAGACUUGGAACGA UGAC	90/91/92
0089	Subunidade V-ATPase A	ise2c.pk001.d19	AACCCCTTGAATGTTAAGG TCGG	CCCCUUGAUGUUAAGGUC	GACCUUAACAUUCAA GGGG	93/94/95
0090	Subunidade V-ATPase A	ise2c.pk001.d19	AAGTACACCATGTTTCAAG TATG	GUACACCAUGUUGCAAGUA	UACUUGCAACAUGGU GUAC	96/97/98
0091	Subunidade V-ATPase A	ise2c.pk001.d19	AACGTGTTCATGATGGCTG ACTC	CGUGUCCAUGAUGGCUGAC	GUCAGCCAUCUAGGA CACG	99/100/101
0092	Subunidade H+-ATPase tipo V	ise2c.pk001.e14	AAACCTACAAAATGGCCG AAAAC	ACCUACAAA AUGGCCGAAA	UUUCGGCCAUUUUGU AGGU	102/103/104

0093	Subunidade H+-ATPase tipo V	ise2c.pk001.e14	AATCTACGGACCCCTTCTTT GGAG	UCUACGGACCCUUCUUUGG	CCAAAAGAGGGUCCG UAGA	105/106/107
0094	Subunidade V-ATPase A	ise2c.pk001.f20	AATCTTGACGTCAATCTCT ACGT	CUCUGACGUCAUCAUCUAC	GUAGAUGAUGACGUC	108/109/110
0095	Subunidade V-ATPase A	ise2c.pk001.f20	AAGTGCTGGGTAACCCCG ACAG	GUGCUUGGUAACCCCGAC	GUCGGGUUACCCAA GCAC	111/112/113
0096	Subunidade V-ATPase A	ise2c.pk001.f20	AATGGGCTCATCTCTCTACA GCAA	CUGGCUCAUCUCCUACAGC	GCUGAAGGAGAUGAG CCAG	114/115/116
0097	Sequência nova	ise2c.pk010.h3	AAACAGTGGCTCGTAATAT ATTTC	ACAGUGCGUCGUAUAUAU	AUAUAUACGACGCA CUGU	117/118/119
0098	Sequência nova	ise2c.pk010.h3	AAGGCACATGGTCTTTCAC TGAT	GGCACAUUGGUCCUUCACUG	CAGUGAAGGACCAUG UGCC	120/121/122
0099	Sequência nova	ise2c.pk010.h3	AACACCATGACCCCTCTGT ACAA	CACCAUGACCCUCCGUGUAC	GUACACGAGGGGUCAU GGUG	123/124/125
0100	Proteína da cutícula larval LCP-17	ise2c.pk007.k24	AACGAGGCCGGATCTCTTA AGCA	CGAGGCCGGAUCUCUUUAAAG	CUUAAAGAUCCGGC CUCG	457/458/459
0101	Proteína da cutícula larval LCP-17	ise2c.pk007.k24	AACTTCACACATAACTAGA CAAA	CUUCACACAUAAACUAGACA	UGUCUAUUUAUGUGU GAAG	460/461/462
0102	Proteína da cutícula larval LCP-17	ise2c.pk007.k24	AATGCGTGGCGATTTCAAA CTTA	UUAGAAUUUAUAAAGCCAG	CUGGGCUUAUAAUUU CUAA	463/464/465
0103	Repressor transicional	ise2c.pk011.a10	AAAAAACACAGACCACGT TCACA	AAAACACAGACCACGUUCA	UGAAACUGGUCUGUG UUUU	126/127/128
0104	Repressor transicional	ise2c.pk011.a10	AATCGATGGTGTGTATT CGCT	UCGAUGGUGGUGUUAUUCG	CGAAUAACACCACCA UCGA	129/130/131
0105	Sequência nova	ise2c.pk011.h12	AAAGAAAATGCTACGCGT TACGA	AGAAAUGCUACGCGUUAC	GUAAAGCGUAGCAUU UUUU	132/133/134
0106	Sequência nova	ise2c.pk011.h12	AACCTTGGACACTACTGG AAGA	CCCUUGGACACUACUGGAA	UCCAGUAGUGUCCA AGGG	135/136/137
0107	Sequência nova	ise2c.pk011.h12	AAGGATCCTATGTGTACCA GGTT	GGAUCCUAUGUGUACCAAG	CCUGGUACACAUAGG AUCC	138/139/140
0108	Fator de iniciação de tradução 5A	ise2c.pk001.d22	AAACTCGGCACACAAACAC AATGG	ACUCGGCACACAACACAAU	AUUGUGUUGUGGCC GAGU	141/142/143
0109	Fator de iniciação de tradução 5A	ise2c.pk001.d22	AATACGAAGATATCTGCC TTCC	UACGAAGAUAUCUGCCCUU	AAGGCGAGAUUCUU CGUA	144/145/146
0110	Fator de iniciação de tradução 5A	ise2c.pk001.d22	AATCAACAGCTCTTACATA AATG	UCAACAGCUCUUAUAUAAA	UUUAUGUAAGAGCUG UUUA	147/148/149
0111	Fator de iniciação eucariótico eIF-4A	ise2c.pk001.d9	AAAGAAGATCAGAAGATT GGCCG	AGAAGAUCAAGAAUUGGC	GCCAAUUCUUGAUC UUUU	150/151/152
0112	Fator de iniciação eucariótico eIF-	ise2c.pk001.d9	AAAGCCGTCTGTATCCA ACAA	AAGCCGUCGCUAUCCAAC	GUUGGAUAGCAGACG GCUU	153/154/155

0113	4A	Fator de iniciação eucariótico eIF-4A	ise2c.pk001.d9	AATGCTAAATGCCATGCTT GCAT	UGC AAAUGCCAUGC UUGC	GCAAGCAUGGCAUUU AGCA	156/157/158
0114	4A	Fator de iniciação eucariótico eIF-4A	ise2c.pk001.i23	AAGATCAGAAGATTGGCC GGAAG	GAUCAGAAAGAUUGGCCGGA	UCCGGCCAAUCUUCU GAUC	159/160/161
0115	4A	Fator de iniciação eucariótico eIF-4A	ise2c.pk001.i23	AATTCTTCAGCAAAATCGAT ACCA	UUCUUCAGCAAAUCGAUAC	GUAUCGAUUUGCUGA AGAA	162/163/164
0116	4A	Fator de iniciação eucariótico 4A	ise2c.pk001.i23	AAATGCTGTCAAGAGGATT TAAA	AUGCUGUCAAGAGGAUUUA	UAAAUCUUCUUGACA GCAU	165/166/167
0117		Subunidade RNA polimerase sigma SigE	ise2c.pk001.i24	AAGCTCGAGACTTGTCTTT GATG	GCUCGAGACUUGCUCUUGA	UCAAGAGCAAGUCUC GAGC	168/169/170
0118		Subunidade RNA polimerase sigma SigE	ise2c.pk001.i24	AACTGTTAGCTCAAGGTCT GCTA	CUGUUAGCUC AAGGUCUGC	GCAGACCUUGAGCUA ACAG	171/172/173
0119		Subunidade RNA polimerase sigma SigE	ise2c.pk001.i24	AAGACTTTCTATCAGAATT TGCG	GACUUUCUAUCAGAAUUUG	CAAAUUCUGAUAGAA AGUC	174/175/176
0120		Fator de iniciação de tradução 2, subunidade 2 beta	ise2c.pk005.b9	AAACTTAATCATGGACGAC GACA	ACUUAUAUC AUGGACGACGA	UCGUCCUCCAUGAUU AAGU	177/178/179
0121		Fator de iniciação de tradução 2, subunidade 2 beta	ise2c.pk005.b9	AAAGAAGAAAGAAAGAA GGGAG	AGAAGAAGAAAGAAAGGG	CCCUUCUUCUUCUUC UUUCU	180/181/182
0122		Fator de iniciação de tradução 2, subunidade 2 beta	ise2c.pk005.b9	AAGATCAAGAGAATGTCG AGGAT	GAUCAAGAGAAUGUCGAGG	CCUCGACAUUCUCUU GAUC	183/184/185
0123		Proteína putativa sar1	ise2c.pk002.m10	AAAATCGTCGGTTTATGCG ACGT	AAUCGUCGGUUUAGCGAC	GUCGCUAAAACCCGAC GAUU	186/187/188
0124		Proteína putativa sar1	ise2c.pk002.m10	AACTGTCAATAGGCAGTAT GCGT	CUGUCAAUAGGCAGUAUGC	GCAUACUGCCUAUUG ACAG	189/190/191
0125		Proteína putativa sar1	ise2c.pk002.m10	AACCTGTACCAACAGACC ACTGG	CCUGUACCAACAGACCACU	AGUGGUCUGUUGGUA CAGG	192/193/194
0126		Fator de alongamento 1-alpha	ise2c.pk001.c14	AACCAAAAATGGGCAAGG AAAAG	CCAAAAUUGGGCAAGAAA	UUUCCUUGCCCAUUU UUUG	195/196/197
0127		Fator de alongamento 1-alpha	ise2c.pk001.c14	AACGTGTATCACCATCGA TATT	CGUGGUAUCACCAUCGAUA	UAUCGAUGGUGAUAC CACG	198/199/200
0128		Fator de alongamento 1-	ise2c.pk001.c14	AACAAAATGGACTCCACT GAGCC	CAAAAUGGACUCCACUGAG	CUCAGUGGAGUCCAU UUUG	201/202/203

0129	alpha Fator alongamento 1alpha F2	de	ise2c.pk001.d16	AATCGTGACTAACCAA AATGG	UCCGUGACUAAACCAAAAAU	AUUUUUGGUUAGUCA CGGA	204/205/206
0130	Fator alongamento 1alpha F3	de	ise2c.pk001.d16	AACATTGTGCTCATTTGGAC ACGT	CAUUGUCGUCAUUGGACAC	GUGUCCAUGACGAC AAUG	207/208/209
0131	Oligosacril transferase subunidade 48 kDa		ise2c.pk005.h3	AATTTGTGAGACTGGTGGC CGAA	UUUGUGAGACUGGUGGCCG	CGGCCACGAGUCUCA CAAA	421/422/423
0132	Oligosacril transferase subunidade 48 kDa		ise2c.pk005.h3	AATCTGATTGTATTGCGCC CCTC	UCUGAUUGUAUUUCGCCCCC	GGGGCGAAUAACAAU CAGA	424/425/426
0133	Oligosacril transferase subunidade 48 kDa		ise2c.pk005.h3	AACACTCTAGTTCTTGCCCTA TTCT	CACUCUAGUUCUGCCUAUU	AAUAGCCAGAACUAG AGUG	427/428/429
0134	Miosina regulatória cadeia leve	de	ise2c.pk001.d21	AACACACATCACAAATGGC GGATA	CACACAUCACAAUGGCGGA	UCCGCCAUUGUGAUG UGUG	430/431/432
0135	Miosina regulatória cadeia leve	de	ise2c.pk001.d21	AAGGATGGCATCATCGGC AAGAA	GGAUGGCAUCAUCGGCAAG	CUUGCCGAUGAUGCC AUCC	433/434/435
0136	Miosina regulatória cadeia leve	de	ise2c.pk001.d21	AAAGGCTTCATCGACACCG CGAA	AGGCUUCAUCGACACCGCG	CGCGGUGUCGAUGAA GCCU	436/437/438
0137	Sequência nova		ise2c.pk001.j9	AACTCCAAATTATAACCTA CTAG	ACUCCAAUUUAUACCUACU	AGUAGGUUAUAAUUG GAGU	210/211/212
0138	Sequência nova		ise2c.pk001.j9	AAGTACAAGGATCTGATC GGCAA	GUACAAGGAUCUGAUGGCG	GCCGAUCAGAUCCUU GUAC	213/214/215
0139	Sequência nova		ise2c.pk001.j9	AAGACTTTTCTTCATGTGGC CCAT	GACUUUCUUCUGUGGCC	GGGCCACAUGAAGAA AGUC	216/217/218
0140	Sequência nova		ise2c.pk002.f12	AAACAAAGTATCGCCTAC ACCGC	ACAAAGUAUCGCCUACACC	GGUGUAGGCGAUACU UUUG	439/440/441
0141	Sequência nova		ise2c.pk002.f12	AATAGCGTCGATCTTCAAC GACT	UAGCGUCGAUCUUAACGA	UCGUUGAAGAUCGAC GCUA	442/443/444
0142	Transportador de aminoácido acoplado a potássio	de	ise2c.pk001.b14	AACTCATAGAGCTTGATGT GTGG	CUCAUAGAGCUUGAUGUGU	ACACAUCAGCUCUA UGAG	219/220/221
0143	Transportador de aminoácido	de	ise2c.pk001.b14	AAGATGTGGATGACGTCA CTGGT	GAUGUGGAUGACGUCACUG	CAGUGACGCUCAUCCA CAUC	222/223/224

0144	acoplado a potássio	Transportador de aminoácido acoplado a potássio	ise2c.pk001.b14	AACCTTCCTGATTCCTCTCTGTG	CCUUCUGAUUCUCUUCUG	CAGAAAGAGAAUCAGG AAGG	225/226/227
0145	Proteína do canal de K+ retificando internamente	Proteína do canal de K+ retificando internamente	ise2c.pk003.f2	AACAGTGCTTGTGATAAGTGAAC	CAGUGCUUGUGAUAAAGUGA	UCACUUAUCACAAAGC ACUG	228/229/230
0146	Proteína do canal de K+ retificando internamente	Proteína do canal de K+ retificando internamente	ise2c.pk003.f2	AAGTTAATGTTGACTGCCCC TCGA	GUUAAUGGUGACUGCCCCUC	GAGGGCAGUCACCAU UAAC	231/232/233
0147	Proteína do canal de K+ retificando internamente	Proteína do canal de K+ retificando internamente	ise2c.pk003.f2	AATAAAGCGATGACCCCCA TAGGA	UAAAGCGAUGACCCCAUAG	CUAUGCGGUCAUCGC UUAU	234/235/236
0148	Transportador de aminoácido acoplado a potássio	Transportador de aminoácido acoplado a potássio	ise2c.pk005.l20	AAACGGTACTGCAGCAAA AAGAC	ACGGUACUGCAGCAAAAAG	CUUUUUGCUGCAGUA CCGU	237/238/239
0149	Transportador de aminoácido acoplado a potássio	Transportador de aminoácido acoplado a potássio	ise2c.pk005.l20	AAGCTGCATCTTCTTTGGC TCTC	GCUGCAUACUUCUUGGCUC	GAGCCAAGAAGUAUG CAGC	240/241/242
0150	Transportador de aminoácido acoplado a potássio	Transportador de aminoácido acoplado a potássio	ise2c.pk005.l20	AAATGTTTACAGAGACGC GATGA	AUGUUUACAGAGACGCGAU	AUCGCGUCUCUGUAA ACAU	243/244/245
0151	Alfa tubulina	Alfa tubulina	ise2c.pk001.d1	AACGTCGATCTTACCGAGT TCCA	CGUCGAUCUUAACCGAGUUC	GAACUCGGUAAAGAU C GACG	246/247/248
0152	Cadeia de alfa tubulina	Cadeia de alfa tubulina	ise2c.pk001.k6	AATTCAAAAATGCGTGAGTG CATC	UUCAAAAUUGCGUGAGUGCA	UGCACUCACGCAUUU UGAA	249/250/251
0153	Cadeia de alfa tubulina	Cadeia de alfa tubulina	ise2c.pk001.k6	AAATCGTAGACCTAGTCCT CGAC	AUCGUAGACCUAGUCCUCG	CGAGGACUAGGUCUA CGAU	252/253/254
0154	Cadeia de alfa tubulina	Cadeia de alfa tubulina	ise2c.pk001.l2	AAACTCAATTCAAAATGCG TGAG	ACUCAAUUCAAAAUGCGUG	CACGCAUUUUGAAUU GAGU	255/256/257
0155	Cadeia de alfa tubulina	Cadeia de alfa tubulina	ise2c.pk001.l2	AACTTATCACTGGTAAGGA AGAT	CUUAUCACUGGUAAGGAAG	CUUCCUUAACCAUGA UAAG	258/259/260
0156	Ubiquitina quinase	Ubiquitina quinase	ise2c.pk002.b4	AAGAGTTACGAACCGTCA CCATA	GAGUACGAAACCGUCACCA	UGGUGACGGUUCGUA ACUC	261/262/263
0157	Ubiquitina quinase	Ubiquitina quinase	ise2c.pk002.b4	AAACTTAGTCCGGATAATG AAC	ACUUAUGCCGGUAUAUGAA	UUCAUUUAUCCGGACU AAGU	264/265/266
0158	Ubiquitina quinase	Ubiquitina quinase	ise2c.pk002.b4	AAGCGGATGTACGAGAAC CTGTT	GGCGAUGUACGAGAACCCUG	CAGGUUCUGUACAU CGCC	267/268/269
0159	Ribonucleoprotei	Ribonucleoprotei	ise2c.pk001.j16	AAGGACAAGATGCTGAAG	CGACAAGAUGCUGAAGGAG	CUCCUUCAGCAUCUU	270/271/272

	na nuclear 200 kDa helicase		GAGAC		GUCC	
0160	Sqd proteína homóloga (RNA de ligação) ise2c.pk006.h23		AAGATAAAGGTCGCGTGT GGACC	GAUAAAGGUCGCGUGUGGA	UCCACACGCGACCUU UAUC	273/274/275
0161	Sqd proteína homóloga (RNA de ligação) ise2c.pk006.h23		AATGTCAAGACTGATCCAA ACAC	UGUCAAGACUGAUCCAAAC	GUUUGGUAUCAGUCU GACA	276/277/278
0162	Sqd proteína homóloga (RNA de ligação) ise2c.pk006.h23		AACATTGCGAGTCTGAACAG GTGG	CAUUCGAGUCUGAACACAGGU	ACCUGUUCAGACUCG AAUG	279/280/281
0163	Proteína de ligação mRNA ise2c.pk006.m8		AACATAAGTCATGGCCAAT AACG	CAUAAGUCAUGGCCAAUAA	UUAUUGGCCAUGACU UAUG	282/283/284
0164	Proteína de ligação mRNA ise2c.pk006.m8		AAGAACATAATAGTGCCG AAGCC	GAACAUAAUAGUGCCGAAG	CUUCGGCACUAUUUU GUUC	285/286/287
0165	Proteína de ligação mRNA ise2c.pk006.m8		AAACACTGGCAGATCAAG AGGAT	ACACUGGCAGAUCAAGAGG	CCUCUUGAUCUGCCA GUGU	288/289/290
0166	Proteína de ligação mRNA ise2c.pk006.m8		AAGATCTTTGTTGTTGCTC TTAG	GAUCUUUGUUGGUGGUCUU	AAGACCACCAACAAA GAUC	291/292/293
0167	Proteína de ligação mRNA ise2c.pk006.m8		AACAGGTGGTCAATGAGC TGCTG	CAGGUGGUCAAUAGAGCUGC	GCAGCUCAUUGACCA CCUG	294/295/296
0168	Tipo quimotripsina; protease ise2c.pk001.a23		AAGTTGGCTCTGACACTCT TGGC	GUUGGCUCUGACACUCUUG	CAAGACUGUCAGAGC CAAC	297/298/299
0169	Tipo quimotripsina; protease ise2c.pk001.a23		AAATCCGCAAGCTGAGG AGGCA	AUCCGCAAGCUGAGGAGG	CCUCCUCAGCUUUGC GGAU	300/301/302
0170	Tipo quimotripsina; protease ise2c.pk001.a23		AACCGTGTCTTACTGCTG CTCA	CCGUGUUCUACUGCUGCU	AGCAGCAGUAAGAAC ACGG	303/304/305
0171	Tipo quimotripsina; protease ise2c.pk001.a23		AACGTTGTTATGCAATGAA GCTG	CGUUGUUAUGCAUGGAAGC	GCUUCCAUGCAUAAC AACG	306/307/308
0172	Tipo quimotripsina; protease ise2c.pk001.a23		AAAACCTCGCCGGTGAAA ACGCC	AACUUCGCCGGUGAAAACG	CGUUUUCACCGGCGA AGUU	309/310/311
0173	quimotripsinogên io; protease ise2c.pk001.a7		AAATGAAACTGTTCTCTCGC AGTC	AUGAAACUGUUCUCCGAG	CUGCGAGGAACAGUU UCAU	312/313/314
0174	quimotripsinogên ise2c.pk001.a7		AAGAAGCTGAGGAAGAA	GAAGGCUGAGGAAGAAACC	GGUUUCJUCCUCAGC	315/316/317

	io: protease		ACCAG		CUC		CUUC		
0175	quimotripsinogên io: protease	ise2c.pk001.a7	AACCTCTTTCACCGTGTAC TTGG		CUCUUUACCCGUCGUACUU		AAGUACGACGGUGAA AGAG		318/319/320
0176	quimotripsinogên io: protease	ise2c.pk001.a7	AACGACATTGCTGTCTCTCC GCAT		CGACAUUGCUGUCCUCCGC		GCGGAGGACAGCAAU GUCC		321/322/323
0177	quimotripsinogên io: protease	ise2c.pk001.a7	AACATCGGTACTACCCCAAC GTGT		CAUCGGUACUACCCCAACGU		ACGUUGGGUAGUACC GAUG		324/325/326
0178	Actina depolimerizada	ise2c.pk004.c4	AAGACTCAGTACGTATTAT CGCG		GACUCAGUACGUUUUAUUG		CGAUAAUACGUACUG AGUC		327/328/329
0179	Actina depolimerizada	ise2c.pk004.c4	AAGTTGCCATCTTGCTTTT GCAA		GUUGCCAUUCUUGCUUUUUGC		GCAAAAGCAAGAUGG CAAC		330/331/332
0180	Actina depolimerizada	ise2c.pk004.c4	AATCAGTTTGACGCAATGCG CTCA		UCAGUUUGACGCAUGCGCU		AGCGAUUCGUCAAA CUGA		333/334/335
0181	Actina depolimerizada	ise2c.pk004.c4	AATGGCTCTGTGTGTGACA GTTT		UGGCGUCUGGUGUGACAGU		ACUGUCACACCAGAC GCCA		336/337/338
0182	Actina depolimerizada	ise2c.pk004.c4	AACGGGAATACGATCAG TTCCT		CGCGGAUACGAUCAGUUC		GAACUGAUCGUUUUC CGCG		339/340/341
0183	Fator de depolimerização de actina	ise2c.pk004.l4	AAGACTCAGTACGTATTAT CGCG		GACUCAGUACGUUUUAUUG		CGAUAAUACGUACUG AGUC		342/343/344
0184	Fator de depolimerização de actina	ise2c.pk004.l4	AAGTTGCCATCTTGCTTTT GCAA		GUUGCCAUUCUUGCUUUUUGC		GCAAAAGCAAGAUGG CAAC		345/346/347
0185	Fator de depolimerização de actina	ise2c.pk004.l4	AATCAGTTTGACGCAATGCG CTCA		UCAGUUUGACGCAUGCGCU		AGCGAUUCGUCAAA CUGA		348/349/350
0186	Fator de depolimerização de actina	ise2c.pk004.l4	AAAAATGGCGTCTGGTGTG ACAG		AAUUGGCGUCUGGUGUGAC		GUCACACGACGCGC AUUU		351/352/353
0187	Fator de depolimerização de actina	ise2c.pk004.l4	AATACGATCAGTTCTTGA GGAT		UACGAUCAGUUCUUGAGG		CCUCAAGGAACUGAU CGUA		354/355/356
0188	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	AATAATTGTGTCTATACCC TACG		UAUUUGUGUCAUACCCUA		UAGGGUAGACACAA AUUA		357/358/359
0189	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	AAGTCAGTACTGGTCAA ATTCA		GUCAGUGACUGGUCAAAU		AAUUUGACCAGUCAC UGAC		360/361/362
0190	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	AATTAGGAGATGTTGCACC TGGT		UUAGGAGAUGUUGCACCUG		CAGGUGCAACAUCUC CUAA		363/364/365
0191	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	AACAAACGGATGACCTAG GTTTG		CAACGGGAUGACCUAGGUU		AACCUAGGUCAUCCG UUUG		366/367/368
0192	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	AATGCTGCTAGCTCTATGT CTCC		UGCUGCUAGCUCUUAUGUCU		AGACAUAGAGCUAGC AGCA		369/370/371
0193	dismutase;	ise2c.pk005.f21	AATTGTGTCATACCCCTAC		UUUGUGUCAUACCCUACGC		GCGUAGGGUAGUACA		372/373/374

	superóxido		GCAA		CAAA	
0194	superóxido dismutase	ise2c.pk005.f21	AAAGGGCTTCATGTGGA AGGAG	AAGGGCUUCAUGUCGAAGG	CCUUCGACAUGAAGC CCUU	375/376/377
0195	superóxido dismutase	ise2c.pk005.f21	AATTAGGAGATGTTGCACC TGGT	UUAGGAGAUGUUGCACCCUG	CAGGUGCAACAUCUC CUAA	378/379/380
0196	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	AAAGGTACGTAACTATGA GTGGT	AGGUCAGUAAACUAUGAGUG	CACUCAUAGUUACUG ACCU	381/382/383
0197	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	AAGAAATATGCTGTGGCA CACGT	GAAUAUGCUGUGGCACAC	GUGUGCCACAGCAUA UUUC	384/385/386
0198	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	AAC TTGTACCTGATGTATGT CATG	CUUGUACCUGAUGAUGUCA	UGACALCAUCAGGUA CAAG	387/388/389
0199	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	AACATTTGGCTTCAACACTC CTAA	CAUUGGCUUCAACACUCCU	AGGAGUGUUGAAGCC AAUG	390/391/392
0200	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	AAGCGGCTGGAGATCTAT GAGAG	GCGGCUUGGAGAUUAUGAG	CUCAUAGAUCUCCAG CCGC	393/394/395
0201	ecdisona oxidase	ise2c.pk001.c18	AACCTCCCGAGGAGAGC ATTAT	CCCUCCCGAGGAGAGCAUU	AAUGCUUCCUCGGG AGGG	396/397/398
0202	ecdisona oxidase	ise2c.pk001.c18	AACGCCCTACGACTGGAA CTTCA	CGCCCUACGACUGGAACUU	AAGUCCAGUCGUAG GGCG	399/400/401
0203	ecdisona oxidase	ise2c.pk001.c18	AAC TGGACCAACGTGCTG GACTA	CUGGACCAACGUGCUGGAC	GUCCAGCACGUUGGU CCAG	402/403/404
0204	inexina-2	ise2c.pk004.pl	AAACATGGGAAGGAGGT CGCAT	AACAUGGGAAGGAGGUCGC	GCGACCUCCUCCCA UGUU	405/406/407
0205	inexina-2	ise2c.pk004.pl	AAGTTGCTTGTGGACTACT TCCA	GUUGCUUGUGGACUACUUC	GAAGUAGUCCACAAG CAAC	408/409/410
0206	inexina-2	ise2c.pk004.pl	AACGTCGTGGGCCAGATCT TCTT	CGUCGUGGGCCAGAUCUUC	GAAAGALCUGGCCAC GACG	411/412/413
0207	inexina-2	ise2c.pk004.pl	AATACGGTCTTCAGGAAC CGTG	UACGGUCCUUCAGGAACCG	CGGUUCCUGAAGGAC CGUA	415/416/417
0208	inexina-2	ise2c.pk004.pl	AATTTCGCTGATTACCGC ATGG	UUUCGUGAUUUACCGCAU	AUGCGUAAAUCAGC GAAA	418/419/420

Ensaio de alimentação gotículas para avaliação das propriedades inseticidas de 21mer dsRNA contra a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda*

Quantidades de 10 nanoMole de primers 21mer desalgados foram adquiridas da Proligo (Sigma Aldrich, St. Louis, MS). A amostra liofilizada é solúvel em água livre de nuclease, na concentração de 100uMolar. A solução estoque foi então diluída em 20% de sacarose contendo corante de alimentos azul McCormick. Gotas de 0.5 ul desta solução foram dispensadas em um círculo em uma placa de petri de 65 mm selada com parafilme. Sacarose branca foi usada como controle. Entre 20 e 30 lagartas-do-cartucho neonatas foram adicionadas ao meio do círculo de gotas e as placas de petri seladas com parafilme. Depois de duas horas, as neonatas com trato digestivo azul foram retiradas e colocadas em dieta padrão de insetos lepidópteros multiespecíficos. Insetos foram avaliados em 48, 72 e 96 horas após o desafio para mortalidade e inibição do crescimento.

Ensaios de diluição serial começando com uma dose elevada de 20uM e incluindo as concentrações 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6 e 0 uMolar também foram realizados dessa maneira.

Tabela 3.

Primer #	Gene alvo	Rep 1		Rep 2		Média combinada
		Insetos tratados	Média de Peso 72H	Insetos tratados	Média de Peso 72H	
75	Hormônio juvenil diol kinase	9	10	11	11	11
83	Hormônio juvenil diol kinase	15	14	14	12	13
91	V-ATPase subunidade A	14	14	11	15	14
99	Proteína hipotética conservada	16	15	19	16	16
107	Sequência nova (proteína cuticular?)	16	14	13	15	14
115	Fator de iniciação eucariótica 4A	16	9	18	14	12
123	Proteína putativa sar1	16	15	16	17	16

131	Oligosacaril transferase subunidade 48 kDa	17	13	14	15	14
139	Proteína miosina	13	15	16	18	17
147	Proteína do canal de K ⁺ retificando internamente	15	11	15	16	14
155	Cadeia de alfa tubulina	15	10	16	19	15
	sacarose controle	14	17	15	18	18

Ensaio de alimentação de sacarose em gota.

Lagartas recém-eclodidas foram alimentadas com 25 uMolar de dsRNAs. Insetos tratados foram pesados em massa em 72 horas e comparados com os controles de sacarose. 2 repetições do experimento foram calculadas.

Ensaio de alimentação por injeção para avaliação das propriedades inseticidas de 21mer dsRNA contra a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda*

Lagartas de segundo ínstar foram injetadas com um micromanipulador e agulhas de microinjeção puxadas em um instrumento de Sutter (Novato, CA) extrator de agulha horizontal P-2000. A agulha estava de volta carregada com uma solução de dsRNA. Experimentos iniciais de injeção utilizaram uma concentração de 2ug/ul (ver Tabela X). Esta taxa produziu elevada taxa de mortalidade em todos os primers testados. Ensaio posteriores foram realizados com concentrações mais baixas. Corante alimentar azul de McCormick foi incluído na solução de dsRNA para visualizar melhor o processo de injeção. Antes da injeção, os insetos foram afixados a um slide microscópico usando um bastão de cola (Office Depot, Delray Beach, FL). A agulha da injeção foi conectada a uma seringa hipodérmica de 20mL através de um tubo de Teflon. A agulha da injeção foi então montada em um micromanipulador Leitz. A solução de dsRNA foi dispensada da agulha de microinjeção pela pressão do êmbolo da seringa de 20mL. Volumes de injeção foram variáveis, mas em média cerca de 250nL (baseada na injeção de cerca de 20 insetos injetados a partir de um volume de 5uL

carregado na agulha). Após a injeção, os insetos foram removidos da lâmina de microscópio, com o auxílio de um pincel de pêlos de camelo fino umedecido. Os insetos foram então colocados em uma dieta multiespecífica e foram avaliados para mortalidade em 24 e 48 horas. Injeções de água foram utilizadas como controle. Controle Negativo Silencer® # 1, 2 e Primers de controle de siRNA 3 da Ambion (Austin , TX) também foram incluídos como controles negativos.

10 Tabela 4

Primer #	Gene alvo	No. injetados	Vivos	Mortos
75	Hormônio juvenil diol kinase	6	0	6
83	Hormônio juvenil diol kinase	6	0	6
91	V-ATPase subunidade A	8	3	5
99	Sequência hipotética conservada	8	0	8
107	Nova sequência (proteína cuticular)	8	0	8
115	Fator de iniciação Eucariótica 4A	8	0	8
123	Proteína putativa sar1	8	1	8
131	Oligossacaril transferase subunidade 48 kDa	8	2	8
147	Proteína do canal de K ⁺ retificando internamente	8	1	7
	Água	8	7	1

Microinjeção de dsRNAs [2ug/ul].

Tabela 5

Microinjeção de dsRNAs [0.7ug/ul] em larvas neonatas FAW

Primer #	Gene alvo	Rep 1			Rep 2		
		# Injetados	24H mortos	48H mortos	# Injetados	24H mortos	48H mortos
75	Hormônio juvenil diol quinase 1	7	2	3	11	7	7
83	Hormônio juvenil diol quinase 2	11	10	10	12	6	5
91	V-ATPase subunidade A	13	9	7	9	9	9
99	Proteína hipotética conservada 1				9	2	2
107	Nova sequência (proteína cuticular?)				11	5	6
115	Fator de Iniciação de Eucariótico 4A				8	6	6
123	Proteína putativa sar1				13	9	9
131	Oligossacaril transferase subunidade 48 kDa				8	6	4
139	Proteína miosina				10	4	4
147	Proteína do canal de K ⁺ retificando internamente				14	8	9
155	Cadeia de alfa tubulina				11	9	9
	Primer de controle Ambion 1	6	0	0	11	0	0
	Primer de controle Ambion 2	11	0	0	8	0	0
	Primer de controle Ambion 3	12	1	1	9	1	1

Ensaio de microinjeção usando doses de 0.7ug/ul de dsRNA 21mers. Nota; Em algumas ocasiões, a mortalidade foi menor em 48 horas que em 24 horas. Isto é devido a insetos moribundos recuperados em pontos mais tarde.

5

Ensaio de dieta tópica para avaliação das propriedades inseticidas de 21mer dsRNA contra a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda*

O termo "ensaio de dieta tópica" refere-se a ensaios onde
10 as dietas artificiais são pipetadas em placas de poliestireno e solução de dsRNA é dispensada na superfície da dieta. Nos experimentos de dsRNA, 100 ul da dieta foram dispensados por poço. A superfície do poço foi então tratada com 10 ul de uma solução de dsRNA de concentrações variadas. As placas foram
15 então infestadas com uma lagarta-do-cartucho recém-nascida por placa e seladas com mylar. O selo mylar foi perfurado com um pequeno pino de inseto para permitir a troca de ar. As placas foram então armazenadas em uma câmara de crescimento a 28C e o ensaio foi marcado para o nanismo ou mortalidade em 4 dias. As
20 Tabelas 6-12 representam vários experimentos usando este método. A Tabela 13 apresenta um resumo dos dados.

No ensaio tópico # 1, os primers, que anteriormente apresentaram atividade em ensaios de injeção foram testados em um ensaio de dieta tópica FAW. Estes resultados são
25 apresentados na Tabela 6. A solução de 50uMolar (0.66ug/ul) foi usada como concentração de ensaio. 5 ul dessa amostra foi carregado para o topo de 100ul da dieta produzindo uma concentração final de 2.5uMolar ou 30 ppm. Em adição a A1-A11 (A12 é um controle negativo), as demais amostras são aquelas
30 com nenhum humano ortólogo conhecido. A placa foi infestado com aprox. 5 neonatos/placa. A contagem do período foi de 72 horas.

No ensaio tópico # 2, primers foram testados em um ensaio de dieta tópica FAW, e os resultados são mostrados na tabela 7. Neste experimento, um estoque de 2,7 ug/ul foi diluído para uma concentração inicial de 0.67ug/ul. 2 diluições seriais foram realizadas para a produção de estoques de 0.32ug/ul e 0.16ug/ul. 5 ul desses estoques foram adicionados à dieta de 100ul para produzir concentrações finais de 30, 15 e 8 ppm na dieta. A contagem do período foi de 72 horas.

No ensaio tópico # 3, primers foram testados em um ensaio de dieta tópica FAW, e os resultados são mostrados na tabela 8. Neste experimento, um estoque de 2,7 ug /ul foi diluído para uma concentração inicial de 0.67ug/ul. 2 diluições seriais foram realizadas para a produção de estoques de 0.32ug/ul e 0.16ug/ul. 5ul desses estoques foram adicionados à dieta de 100ul para produzir concentrações finais de 30, 15 e 8 ppm na dieta. Esta é uma repetição da experiência anterior. A contagem do período foi de 72 horas.

No ensaio tópico # 4, primers foram testados em um ensaio de dieta tópica FAW, e os resultados são mostrados na tabela 9. Neste experimento, o estoque de 2,7 ug /ul foi diluído para uma concentração inicial de 0.67ug/ul. 2 diluições seriais foram realizadas para a produção de estoques de 0.32ug/ul e 0.16ug/ul. 5 ul desses estoques foram adicionados à dieta de 100ul produzindo concentrações finais de 30, 15 e 8 ppm na dieta. A contagem do período foi de 72 horas.

Um resumo dos dados do ensaio tópico apresentados nas tabelas 6-9 aparece na Tabela 10.

No ensaio tópico # 5, primers foram testados em um ensaio de dieta tópica FAW e os resultados são apresentados na Tabela 11. 50ul de 0.16ug/ul de primers foram misturados com 50 ul de água e, em seguida, diluídos em série. 10ul da amostra, em seguida, foi adicionada ao poços. Assim a primeira concentração foi 10ul x 0.08ug/ul = 0,8 ug de dsRNA

total/dieta de 100ul = 8 ppm. Esta foi metade da taxa de experimentos anteriores (ensaios # 1-4), onde 5 ul de 0,32 apresentaram atividade. A contagem do período foi de 72 horas. A pontuação do "S" indica desnutrição clara em relação aos 5 controles. A pontuação de "ss" indica insetos vivos, mas apresentando desnutrição severa definida como pouco ou nenhum crescimento para além do tamanho do corpo do recém-eclodido.

No ensaio tópico # 6, primers foram testados em um ensaio de dieta tópica FAW e os resultados são apresentados na Tabela 10 12. A primeira taxa é 10 ul de 0,16 ug/ul do estoque de primer. De lá, 50ul de 0.16ug/ul de primer misturado com 50 ul de água e, em seguida, diluído em série. 10ul da amostra foi então adicionado aos poços. Por conseguinte a primeira concentração foi 10ul x 0.16ug/ul = 1.6ug de dsRNA total/dieta 15 de 100ul = 16 ppm. A contagem do período foi de 72 horas.

Tabela 6. (Nota: a sequência de primer de RNA senso e sequências de primer de RNA antisenso mostradas na tabela 6 foram geradas com 2 resíduos de timina na extremidade 3'.)

Amostra	seq id	gene id	Sequência alvo	dianeteira	reversa	30 ppm	SEQ ID NO Região senso/antisenso
0075	ise1c.pk002.m13	Investigação do hormônio juvenil	AACATGGTATCCGACTTC AGGAA	CAUGGUAUCCGACU CAGG	CCUGAAGUCGGAU ACCAUG		51/52/53
0083	ise1c.pk005.a15	Investigação do hormônio juvenil	AAGTTCGCGTTCACCTCTT GAAGA	GUUCGCGUUCACUCU UGAA	UUCAAAGAGUGAAC GCGAAC	+	75/76/77
0085	ise1c.pk006.d24	Investigação do hormônio juvenil	AATCACGCTGAAACCAC TGTATA	UCACGCGUGAAACCAC UGUA	UACAGUGGUUUA GCGUGA	+	81/82/83
0086	ise2c.pk009.i4	Investigação do hormônio juvenil	AAAATATGGCGCGCCTA TTGTTT	AAUAUGGCGCGCCUA UUGU	ACAAUAGGCGCGC CAUAUU		84/85/86
0088	ise2c.pk009.i5	Investigação do hormônio juvenil	AAGTCATCGTTCCAAAGTC TACCT	GUCAUCGUUCCAAAGU CUAC	GUAGACUUGGAAC GAUGAC	+	90/91/92
0089	ise2c.pk001.d19	Investigação vacuolar	AACCCCTTGAATGTTAAG GTCGG	CCCCUUGAAUGUUAA GGUC	GACCUUAACAUAUC AAGGGG	+	93/94/95
0091	ise2c.pk001.d20	Investigação vacuolar	AACGTGTCCATGATGGCT GACTC	CGUGUCCAUGAUGGC UGAC	GUCAGCCAUAUG GACACG	+	99/100/101
0094	ise2c.pk001.f20	Investigação vacuolar	AACTCTGACGTCATCATC TACGT	CUCUGACGUCAUCAU CUAC	GUAGAUGAUGAC GUCAGAG	+	108/109/110
0095	ise2c.pk001.f21	Investigação vacuolar	AAGTGCTTGGGTAACCCC GACAG	GUGCUUGGGUAAACCC CGAC	GUCGGGUUAACCC AAGCAC	+	111/112/113
0099	ise2c.pk010.h3	Investigação da caderina	AACACCATGACCCCTCGTG TACAA	CACCAUGACCCUCGU GUAC	GUACACGAGGGUC AUGGUG		123/124/125
0107	ise2c.pk011.h12	Proteína cuticular	AAGGATCCTATGTGTACC AGGTT	GGAUCCUAUGUGUAC CAGG	CCUGGUACACAUA GGAUCC	+	138/139/140
0115	ise2c.pk001.i23	Fator de iniciação traducional	AATTCTTCAGCAAAATCGA TACCA	UUCUUCAGCAAAUCG AUAC	GUUUCGAUUUGCU GAAGAA		162/163/164
0123	ise2c.pk002.m10	SAR1	AAAATCGTCGGTTTTAGC GACGT	AAUCGUCGGUUUUAG CGAC	GUCGCUAAAACCG ACGAUU		186/187/188

0131	ise2c.pk005.h3	fosfolipossacarídeo	AATTTGTGAGACTGGTGG CCGAA	UUUGUGAGACUGGUG GCCG	CGGCCACCAGUCL CACAAA	421/422/423
0139	ise2c.pk001.j9	Miosina	AAGACTTTCITTCATGTGG CCCAT	GACUUUCUUAUGUG GCC	GGGCCACAUGAAG AAAGUC	216/217/218
0147	ise2c.pk003.f2	Potássio internamente retificando proteína	AATAAAGCGATGACCCC ATAGGA	UAAAGCGAUGACCCC AUAG	CUAUGGGGUCAUC GCUUUA	234/235/236
0155	ise2c.pk001.l2	Tubulina	AAC TTATCACTGGTAAGG AAGAT	CUUAUCACUGGUAAG GAAG	CUUCCUUAACCAGU GAUAAG	258/259/260

Tabela 7 (Nota: a sequência de primer de RNA senso e as sequência de primer de RNA antisenso mostradas na tabela 7 foram geradas com 2 resíduos de timina na extremidade 3'.)

Amostra	seq id	gene id	Sequência alvo	dianteira	reversa	SEQ ID NO	
						30 ppm	Região senso/antisenso alvo/
0075	ise1c.pk0 02.m13	Investigação do hormônio juvenil	AACATGGTATCCGAC TTCAGGAA	CAUGGUUCCGACUUC AGG	CCUGAAGUCGGAU ACCAUG		51/52/53
0076			AAGTGCGCTGACGA GAACAAGGA	GGUCGCUGACGAGAAC AAG	CUUGUUCUGUCA GCGACC		54/55/56
0077			AAGTGCTCTGGGCTT GAGTTCCA	GUGUCCUGGGCUUGAG UUC	GAACUCAAGCCCA GGACAC		57/58/59
0078	ise1c.pk0 03.f7	Investigação do hormônio juvenil	AAGAAGAAGCTCCT CCACGTGTT	GAAGAAGCUCCUCCAC GUG	CACGUGGAGGAGC UUCUUC		60/61/62
0079			AAGTGCTGCTGACGA GAACAAGGA	GGUCGCUGACGAGAAC AAG	CUUGUUCUGUCA GCGACC		63/64/65
0080			AATGCTCTGGGGCTG AGTTCAA	UGUCCUGGGGCGUGAGU UUC	GAAACUCAGCCCCA GGACA		66/67/68
0081	ise1c.pk0 05.a15	Investigação do hormônio juvenil	AAGAATAAGCTCCTC CACGTGTT	GAUAAGCUCCUCCAC GUG	CACGUGGAGGAGC UUAUUC		69/70/71

0082			AATTGTGCGAGGAG ACCTATTG	UUUGUCGAGGAGACCC UAU	AUAGGGUCUCCUC GACAAA		72/73/74
0083			AAGTTGCGGTTCAC CTTGAAGA	GUUCGGGUUCACUCU GAA	UUCAAGAGUGAAC GCGAAC	+	75/76/77
0084	ise1.c.pk0 06.d24	Investigação do hormônio juvenil	AACTGCCCCCTTAAC TCATCTAT	CUGCCCCUUAACCUCA UCU	AGAUGAGGUUAAG GGGCAG		78/79/80
0085			AATCAGCGTGAAAC CACTGTATA	UCACGCUGAAACCACU GUA	UACAGUGGUUUA GCGUGA		81/82/83
0086	ise2.c.pk0 09.i4	Investigação do hormônio juvenil	AAAATATGGCGCGC CTATTGTTT	AAUAGGCGCGCCUUA UGU	ACAAUAGGCGCGC CAUAUU		84/85/86
0087			AACGTTCTCGGTCTT TCACTGCT	CGUUCUGGGUUCUUUA CUG	CAGUGAAAAGACCG AGAACG		87/88/89
0088			AAGTCATCGTTCCAA GTCTACCT	GUCAUCGUUCCAAGUC UAC	GUAGACUUGGAAC GAUGAC		90/91/92
0089	ise2.c.pk0 01.d19	Investigação vacuolar	AACCCCTTGAATGTT AAGGTCGG	CCCCUUGAAUGUUAAG GUC	GACCUUAACAUAUC AAGGGG		93/94/95
0090			AAGTACACCATGTTG CAAGTATG	GUACACCAUGUUGCAA GUA	UACUUGCAACAUG GUGUAC		96/97/98
0091			AACGTGTCCATGATG GCTGACTC	CGUGUCCAUGAUGGCU GAC	GUCAGCCAUAUG GACACG		99/100/101
0092	ise2.c.pk0 01.e14	Investigação vacuolar	AAACCTACAAAATG GCCGAAAAC	ACCUACAAA AUGGCCG AAA	UUUCGGCCAUUUU GUAGGU		102/103/104
0093			AATCTACGGACCCCTT CTTTGGAG	UCUACGGACCCUUCUU UGG	CCAAAGAAAGGGUC CGUAGA		105/106/107
0094	ise2.c.pk0 01.f20	Investigação vacuolar	AACTCTGACGTGTC ATCTACCT	CUCUGACGUCAUCAUC UAC	GUAGAUGAUGACG UCAGAG		108/109/110
0095			AAGTGCTTGGGTAAC CCCCGACAG	GUGCUUGGGUAACCCC GAC	GUCGGGUUACCC AAGCAC		111/112/113

0096			AAC TGGCTCATCTCC TACAGCAA	CUGGCUCAUCUCCUAC AGC	GCUGAGGAGAUG AGCCAG	114/115/116
0097	ise2c.pk0 10.h3	Investigação da caderina	AAACAGTGGTCGT AATATATTC	ACAGUGCGUGGUAUA UAU	AUAUAUACGACG CACUGU	117/118/119
0098			AAGGCACATGTCCT TCACTGAT	GGCACAUGGUCCUUA CUG	CAGUGAAGGACCA UGUGCC	120/121/122
0099			AACACCATGACCCCTC GTGTACAA	CACCAUGACCCUUGUG UAC	GUACACGAGGGUC AUGGUG	123/124/125
0100	ise2c.pk0 07.k24	Proteína cuticular	AACGAGGCCGGATC TCTTAAGCA	CGAGGCCGGGUAUCUU AAG	CUUAAGAGAUCCG GCCUCG	457/458/459
0101			AAC TTCACACATAAC TAGACAAA	CUUCACACAUAAACUAG ACA	UGUCUAGUUAUGU GUGAAG	460/461/462
0102			AATGCGTGCGGATTT CAAACTTA	UUAGAAUUUAUAAAGCC CAG	CUGGGCUUAUAAU UUCUAA	463/464/465
0103	ise2c.pk0 11.a10	Proteína cuticular	AAAAAACACAGACC ACGTTACAA	AAAACACAGACCACGU UCA	UGAACGUGGUCUG UGUUUU	126/127/128
0104			AATCGATGGTGGTGT TATTCGCT	UCGAUGGUGGUGUUUAU UCG	CGAAUAACACCACC AUCGA	129/130/131
0105	ise2c.pk0 11.h12	Proteína cuticular	AAAGAAAATGCTAC GCGTTACGA	AGAAAAUGCUACGCGU UAC	GUAACGCGUAGCA UUUUCU	132/133/134
0106			AACCCCTGGACACTA CTGGAAGA	CCCUUGGACACUACUG GAA	UUCAGUAGUGUC CAAGGG	135/136/137
0107			AAGGATCCTATGTGT ACCAGGTT	GGAUCCUAUGUGUACC AGG	CCUGGUACACAU GGAUCC	138/139/140
0108	ise2c.pk0 01.d22	Fator de iniciação da tradução	AAACTGGGCACACA ACACAATGG	ACUCGGCACACAACAC AAU	AUUGUGUUGUGUG CCGAGU	141/142/143
0109			AATACGAAGATATCT GCCCTTCC	UACGAAGAUUUCUGCC CUU	AAGGGCAGAUUUC UUCGUA	144/145/146

0110			AATCAACAGCTCTTA CATAAATG	UCAAACAGCUCUUAACAU AAA	UUUAUGUAAGAGC UGUUGA	147/148/149
0111	ise2c.pk0 01.d9	Fator de iniciação da tradução	AAAGAAAGATCAGAA GATTGGCCG	AGAAGAUCAGAGAAGAUU GGC	GCCAAUCUUCUGA UCUUCU	150/151/152
0112			AAAAGCCGTCTGCTA TCCAACAA	AAGCCGUCUGCUAUCC AAC	GUUGGAUAGCAGA CGGCUU	153/154/155
0113			AATGCTAAATGCCAT GCTTGCAAT	UGC AAAUGCCCAUGCU UGC	GCAAGCAUGGCAU UUAGCA	156/157/158
0114	ise2c.pk0 01.i23	Fator de iniciação da tradução	AAGATCAGAAAGATT GGCCGGAAG	GAUCAGAGAAGUUUGCC GGA	UCCGGCCAAUCUUC UGAUC	159/160/161
0115			AATTCTTCAGCAAAAT CGATACCA	UUCUUCAGCAAAUUCGA UAC	GUUUCGAUUUUGCU GAAGAA	162/163/164
0116			AAATGCTGTCAAGA GGATTTAA	AUGCUGUCAAGAGGAU UUA	UAAUCCUUCUUGA CAGCAU	165/166/167
0117	ise2c.pk0 01.i24	Fator de iniciação da tradução	AAGCTCGAGACTTGC TCTTGATG	GCUCGAGACUUGCUCU UGA	UCAAGAGCAAGUC UCGAGC	168/169/170
0118			AACGTGTAGCTCAAG GTCTGCTA	CUGUAGCUCUAAAGGUC UGC	GCAGACCUUGAGC UAACAG	171/172/173
0119			AAGACTTTCTATCAG AATTGCG	GACUUCUUAUCAGAAU UUG	CAAUUCUGAUAG AAAGUC	174/175/176
0120	ise2c.pk0 05.b9	Fator de iniciação da tradução	AAACTTAATCATGGA CGACGACA	ACUUAUUAUGGACGA CGA	UCGUCGUCCAUGA UUAAAGU	177/178/179
0121			AAAGAAGAAGAAAGA AGAAAGGAG	AGAAGAAGAAGAAAGAA GGG	CCCUUCUUCUUCUU CUUCU	180/181/182
0122			AAGATCAAGAGAAT GTGAGGAT	GAUCAAGAGAAUGUCG AGG	CCUCGACAUUCUCU UGAUC	183/184/185
0123	ise2c.pk0 02.m10	SARI	AAAATCGTCGGTTTT AGCGACGT	AAUCGUCGGUUUUUAGC GAC	GUCGCUAAAAACCG ACGAUU	186/187/188

0124			AACGTGTC AATAGGC AGTATGCGT	CUGUCAAUAGGCAGUA UGC	GCAUACUGCCUAAU UGACAG		189/190/191
0125			AACCTGTACCAACA GACCACTGG	CCUGUACCAACAGACC ACU	AGUGGUCUGUUGG UACAGG	+	192/193/194
0126	ise2c.pk0 01.c14	Fator de alongamento	AACCAAAAATGGGC AAGGAAAAG	CCAAAAAUGGGCAAGG AAA	UUUCCUUGCCCAU UUUUGG	+	195/196/197
0127			AACGTGTGTATCACCA TCGATATT	CGUGUAUCACCAUCG AUA	UAUCGAUGGUGAU ACCACG	+	198/199/200
0128			AACAAAATGGACTC CACTGAGCC	CAAAAUGGACUCCACU GAG	CUCAGUGGAGUCC AUUUUG		201/202/203
0129	ise2c.pk0 01.d16	Fator de alongamento	AATCCGTGACTAACC AAAAATGG	UCCGUGACUAAACCAA AAU	AUUUUUGGUUAGU CACGGA	+	204/205/206
0130			AACATTGTCGTCATT GGACACGT	CAUUGUCGUCAUUGGA CAC	GUGUCCAAUGACG ACAAUG		207/208/209
0131	ise2c.pk0 05.h3	fosfooligoss acarídeo...	AATTGTGAGACTGG TGCCCGAA	UUUGUGAGACUGGUGG CCG	CGGCCACAGUCUC ACAAA		421/422/423
0132			AATCTGATTGTATTC GCCCCCTC	UCUGAUUGUAUUCGCC CCC	GGGGCGGAAUACA AUCAGA		424/245/426
0133			AACACTCTAGTTCTG CCTATTCT	CACUCUAGUUCUGCCU AUU	AAUAGGCAGAACU AGAGUG		427/228/429
0134	ise2c.pk0 01.d21	Miosina	AACACACATCACAA TGCGGGATA	CACACAUCACAAUUGGC GGA	UCCGCCAUUGUGA UGUGUG		430/431/432
0135			AAGGATGGCATCAT CGGCAAGAA	GGAUGGCAUCAUCGGC AAG	CUUGCCGAUGAUG CCAUC		433/434/435
0136			AAAGCTTCATCGAC ACCGCGAA	AGGCUUCAUCGACACC GCG	CGCGGUGUCGAUG AAGCCU		436/437/438
0137	ise2c.pk0 01.j9	Miosina	AAACTCCAATTATATA CCTACTAG	ACUCCAAUUUAACCCU ACU	AGUAGGUUAUAAU UGGAGU		210/211/212

0138			AAGTACAAGGATCT GATCGGCAA	GUACAAGGAUCUGAUC GGC	GCCGAUCAGAUCC UUGUAC	+	213/214/215
0139			AAGACTTTCATG TGGCCAT	GACUUCUUAUGUGG CCC	GGCCACAUGAAG AAAGUC		216/217/218
0140	ise2c.pk0 02.f12	Miosina	AAACAAAGTATCGC CTACACCGC	ACAAAGUAUCGCCUAC ACC	GGUGAAGGCGAUA CUUUGU		439/440/441
0141			AATAGCGTCGATCTT CAACGACT	UAGCGUCGAUCUUCAA CGA	UCGUUGAAGAUUG ACGCUA		442/443/444
0142	ise2c.pk0 01.b14	Transportad or de aminoácido no canal de potássio	AACATCATAGAGCTTG ATGTGTGG	CUCAUAGAGCUUGAUG UGU	ACACAUCAAGCUC UAUGAG		219/220/221
0143			AAGATGTGGATGAC GTCACCTGGT	GAUGUGGAUGACGUA CUG	CAGUGACGUAUC CACAU		221/223/224
0144			AACCTCTCTGATCTT CTTCTGTG	CCUUCUGAUUCUCUU CUG	CAGAAGAGAAUCA GGAAGG		225/226/227
0145	ise2c.pk0 03.f2	Potássio retificando internamente ...	AACAGTGTCTGTGAT AAGTGAAC	CAGUGCUUGUGAUAA UGA	UCACUUAUCACAA GCACUG	+	228/229/230
0146			AAGTTAATGGTGACT GCCCTCGA	GUUAAUGGUGACUGCC CUC	GAGGGCAGUCACC AUUAAC	+	231/232/233
0147			AATAAAGCGATGAC CCCATAGGA	UAAAGCGAUGACCCCA UAG	CUAUGGGGUAUC GCUUUA	+	234/235/236
0148	ise2c.pk0 05.l20	Transportad or de aminoácido	AAACGGTACTGCAG CAAAAAGAC	ACGGUACUGCAGCAAA AAG	CUUUUUGCUGCAG UACCGU	+	237/238/239
0149			AAGCTGCATACITCT TGGCTCTC	GCUGCAUACUUCUUGG CUC	GAGCCAAGAAAGUA UGCAGC	+	240/241/242
0150			AAATGTTTACAGAG ACCGGATGA	AUGUUUACAGAGACGC GAU	AUCGCGUCUCUGU AAACAU	+	243/244/245

0151	ise2c.pk0 01.d1	tubulina	AACGTCGATCTTACC GAGTTCCA	CGUCGAUCUUAACCGAG UUC	GAACUCGGUAAGA UCGACG	+	246/247/248
0152	ise2c.pk0 01.k6	tubulina	AATTCAAAAATGCGTG AGTGCATC	UUCAAAAUUGCGUGAGU GCA	UGCACUCACGCAU UUUGAA		249/250/251
0153			AAATCGTAGACCTA GTCCTCGAC	AUCGUAGACCUAGUCC UCG	CGAGGACUAGGUC UACGAU	+	252/253/254
0154	ise2c.pk0 01.l2	tubulina	AAACTCAATTCAAA ATGCGTGAG	ACUCAAUUCAAAAAUGC GUG	CACGCAUUUUUGAA UUGAGU	+	255/256/257
0155			AACATTATCACTGGTA AGGAAGAT	CUUAUCACUGGUAAAG AAG	CUUCCUUAACCAGU GAUAAG		258/259/260
0156	ise2c.pk0 02.b4	ubiquitina	AAGAGTTACGAACC GTCACCATA	GAGUUAACGAACCGUCA CCA	UGGUGACGGUUCG UAACUC		261/262/263
0157			AAACTTAGTCCGGAT AATGAACC	ACUUAUUCGCGGAUAAU GAA	UUCAUUAUCCCGGA CUAAGU	+	264/265/266
0158			AAGGCGATGTACGA GAACTGTGT	GGCGAUGUACGAGAAC CUG	CAGGUUCUCGUAC AUCGCC	+	267/268/269
0159	ise2c.pk0 01.j16	Ribonucleoproteína nuclear pequeña	AACGACAAGATGCT GAAAGGAGAC	CGACAAGAUGCUGAAG GAG	CUCCUUCAGCAUCU UGUCG	+	270/271/272
0160	ise2c.pk0 06.h23	Ribonucleoproteína nuclear pequeña	AAGATAAAGGTCGC GTGTGGACC	GAUAAAGGUUCGCGUGU GGA	UCCACACGCGACCU UUAUC		273/274/275
0161			AATGTCAAAGACTGAT CCAAACAC	UGUCAAGACUGAUCCA AAC	GUUUGGAUCAGUC UUGACA		276/277/278
0162			AACATTTCGAGTCTGA ACAGGTGG	CAUUCGAGUCUGAACA GGU	ACCUGUUCAGACU CGAAUG	+	279/280/281

Tabela 8. (Nota: a sequência de primer de RNA senso e as sequências de primer de RNA antisenso mostradas na tabela 8 foram geradas com 2 resíduos de timina na extremidade 3'.)

Amostr a	seq id	gene id	Sequência alvo	dianeteira	reversa	30 ppm	SEQ ID NO Região senso/antisenso	alvo/ senso/antisenso
0075	ise1c.pk002. ml3	Investigação do hormônio juvenil	AACATGGTATCCGACT TCAGGAA	CAUGGUAUCCGACUUA GG	CCUGAAAGCGGAUA CCAUG		51/52/53	
0076			AAGGTCGCTGACGAG ACAAGGA	GGUCGUGACGAGAACA AG	CUUGUUCUGUCAG CGACC		54/55/56	
0077			AAGTGTCTGGGCTTG AGTTCCA	GUGUCCUGGGCUUGAGU UC	GAACUCAAGCCCAG GACAC		57/58/59	
0078	ise1c.pk003.f 7	Investigação do hormônio juvenil	AAGAAGAAAGCTCCTC CACGTGTT	GAAGAAGCUCCUCCACG UG	CACGUGGAGGAGCU UCUUC		60/61/62	
0079			AAGGTCGCTGACGAG ACAAGGA	GGUCGUGACGAGAACA AG	CUUGUUCUGUCAG CGACC		63/64/65	
0080			AATGTCTGGGCTGA GTTTCAA	UGUCCUGGGGUGAGUU UC	GAAACUCAGCCCCA GGACA	+	66/67/68	
0081	ise1c.pk005.a 15	Investigação do hormônio juvenil	AAGAATAAGCTCCTCC ACGTGTT	GAAUAGCUCCUCCACG UG	CACGUGGAGGAGCU UAUUC		69/70/71	
0082			AATTGTGAGGAGA CCCTATTG	UUUGCGAGGAGACCCU AU	AUAGGUCUCCUCCG ACAAA		72/73/74	
0083			AAGTTCGCGTTCACTC TTGAAGA	GUUCGCGUUCACUCUUG AA	UUCAAAGAGUGAACG CGAAC	NT	75/76/77	
0084	ise1c.pk006.d 24	Investigação do hormônio juvenil	AAC TGCCCCCTTAACCT CATCTAT	CUGCCCCCUAAACCUCAC U	AGAUGAGGUUAAGG GGCAG	+	78/79/80	
0085			AATCACGCTGAACCC ACTGTATA	UCACGCGUAAACCACUG UA	UACAGUGGUUUCAG CGUGA		81/82/83	
0086	ise2c.pk009.i 4	Investigação do hormônio juvenil	AAAATATGGCGCGCC TAATGTGTT	AAU AUGCGCGCCUUAU GU	ACAAUAGGCGCGCC AUUUU		84/85/86	
0087			AACGTTCCTCGTCTTT CACTGCT	CGUUCUGGUCUUCAC UG	CAGUGAAAGACCGA GAACG		87/88/89	
0088			AATCATCGTTCCCAAG TCTACCT	GUCAUCGUUCCAAAGUCU AC	GUAGACUUGGAACG AUGAC		90/91/92	
0089	ise2c.pk001.d	Investigação	AACCCCTTGAATGTTA	CCCCUUGAAUGUUAAGG	GACCUUAACAUAUA	--	93/94/95	

	19	vacuolar	AGTCTGG	UC	AGGG		
0090			AAGTACACCATGTTC AAGTATG	GUACACCAUGUUGCAAG UA	UACUUGCAACAUGG UGUAC		96/97/98
0091			AACGTGTCCATGATGG CTGACTC	CGUGUCCAUGAUGGCUG AC	GUCAGCCAUAUGG ACACG	+	99/100/101
0092	ise2c.pk001.e 14	Investigação vacuolar	AAACCTACAAAATGG CCGAAAAC	ACCUACAAAUGGCCGA AA	UUUCGGCCAUAUUUG UAGGU		102/103/104
0093			AATCTACGGACCCCTTC TTTGGAG	UCUAGGGACCCUUCUUU GG	CCAAAAGAGGGUCC GUAGA		105/106/107
0094	ise2c.pk001.f 20	Investigação vacuolar	AACTCTGACGTATCA TCTACGT	CUCUGACGUCAUCAUCU AC	GUAGAUGAUGACGU CAGAG		108/109/110
0095			AAGTCTTGGTAACC CCGACAG	GUGCUUGGGUAAACCCCG AC	GUCGGGGUUAACCCA AGCAC		111/112/113
0096			AACTGGCTCATCTCCT ACAGCAA	CUGGCUCAUCUCCUACA GC	GCUGAAGGAGAUGA GCCAG		114/115/116
0097	ise2c.pk010.h 3	Investigação da caderina	AAACAGTGCCTCGTA ATATATTC	ACAGUGCGUGUAUAU AU	AUAUAUUACGACGC ACUGU		117/118/119
0098			AAGGCACATGTCCTT CACTGAT	GGCACAUUGGUCCUUCAC UG	CAGUGAAGGACCAU GUGCC		120/121/122
0099			AACACCATGACCCCTCG TGTACAA	CACCAUGACCCUCCUGU AC	GUACACGAGGGGUA UGGUG		123/124/125
0100	ise2c.pk007.k 24	Proteína cuticular	AACGAGCCGGATCT CTTAAGCA	CGAGGCCGGAUCUCUUA AG	CUUAGAGAUAUCCGG CCUCG		457/458/459
0101			AACTTCACACATAACT AGACAAA	CUUCACACAUAAUAUA CA	UGUCUAGUUAUGUG UGAAG		460/461/462
0102			AATGCTGGCGATTTC AAACTTA	UUAGAAAUAUAAGCCC AG	CUGGGCUUAUAUU UCUAA		463/464/465
0103	ise2c.pk011.a 10	Proteína cuticular	AAAAAACACAGACCA CGTTCACA	AAAAACAGACCACGUU CA	UGAACGUGGUCUGU GUUUU		126/127/128
0104			AATCGATGGTGGTGT ATTCGCT	UCGAUGGGUGUUAUU CG	CGAAUAACACCACC AUCGA	+	129/130/131
0105	ise2c.pk011.h 12	Proteína cuticular	AAAGAAAATGCTACG CGTTACGA	AGAAAAUGCUACGCGUU AC	GUAAACGCGUAGCAU UUUCU		132/133/134
0106			AACCTTGGACACTAC TGGAGA	CCUUGGACACUACUGG AA	UCCAGUAGUGUCC AAGGG		135/136/137
0107			AAGGATCCTATGTGTA CCAGGTT	GGAUCCUAUGUGUACCA GG	CCUGGUACACAUAG GAUCC		138/139/140
0108	ise2c.pk001.d 22	Fator de iniciação da tradução	AAACTCGGCACACAA CACAAATGG	ACUCGGCACACAAACA AU	AUUGUGUUGUGUC CGAGU	+	141/142/143
0109			AATACGAAGATATCT GCCCTTCC	UACGAAGAUAUCUGCCC UU	AAGGGCAGAUUAUCU UCGUA	+	144/145/146

0110			AATCAACAGCTCTTAC ATAAATG	UCAAACAGCUCUUAUA AA	UUUAUGUAAGAGCU GUUGA	+	147/148/149
0111	ise2c.pk001.d 9	Fator de iniciação da tradução	AAAGAAGATCAGAAAG ATTGGCCG	AGAAGAUACAGAAGAUUG GC	GCCAAUUCUUCUGAU CUUCU		150/151/152
0112			AAAAGCCGTCTGCTAT CCAACAA	AAGCCGUCUGCUAUCCA AC	GUUGGAUAGCAGAC GGCUU		153/154/155
0113			AATGCTAAATGCCATG CTTGCAAT	UGCUGAAUAGCCAUUGCUU GC	GCAAGCAUGGCAU UAGCA	+	156/157/158
0114	ise2c.pk001.i 23	Fator de iniciação da tradução	AAGATCAGAAGATTG GCCGGAAG	GAUCAGAAGAUUGGCCG GA	UCCGGCCAAUUCUUC UGAUC	+	159/160/161
0115			AATCTTCAGCAAATC GATACCA	UUCUUCAGCAAAUUCGAU AC	GUUCCGAUUGCUG AAGAA	NT	162/163/164
0116			AAATGCTGTCAAGAG GATTTAAA	AUGCUGUCAAGAGGAU UA	UAAAUCCUCUUGAC AGCAU		165/166/167
0117	ise2c.pk001.l 24	Fator de iniciação da tradução	AAGCTCGAGACTTGCT CTTGATG	GCUCGAGACUUGCUCU GA	UCAAGAGCAAGUCU CGAGC	+	168/169/170
0118			AACTGTTAGCTCAAGG TCTGCTA	CUGUAGCUCUAGGUCU GC	GCAGACCUUGAGCU AACAG	+	171/172/173
0119			AAGACTTCTATCAGA ATTGCG	GACUUCUUAUCAGAAU UG	CAAAUUCUGAUGA AAGUC		174/175/176
0120	ise2c.pk005.b 9	Fator de iniciação da tradução	AAACTTAATCATGGAC GACGACA	ACUUAUAUCAUGGACGAC GA	UCGUCCUGCAUGAU UAAAGU		177/178/179
0121			AAAGAAGAAGAAAGAA GAAGGGAG	AGAAGAAGAAGAAGAAG GG	CCUUCUUCUUCUUC UUCU	+	180/181/182
0122			AAGATCAAGAGAATG TCGAGGAT	GAUCAAGAGAUGUCGA GG	CCUCGACAUUCUCU UGAUC	+	183/184/185
0123	ise2c.pk002. m10	SARI	AAAATCGTCGGTTTA GCGACGT	AAUCGUCGGUUUUAAGCG AC	GUUGCUAAAACCGA CGAUU	+	186/187/188
0124			AACTGTCAATAGGCA GTATGCGT	CUGCAAAUAGGCAGUAU GC	GCAUACUGCCUAU GACAG	+	189/190/191
0125			AACCTGTACCAACAG ACCACTGG	CCUGUACCAACAGACCA CU	AGUGGUCUGUUGGU ACAGG	+	192/193/194
0126	ise2c.pk001.c 14	Fator de alongamento	AACCAAAAATGGGCA AGGAAAAG	CCAAAAUUGGGCAAGGA AA	UUUCUUGCCCCAU UUUGG	+	195/196/197
0127			AACGTGGTATCACCAT CGATATT	CGUGUAUCACCAUCCGA UA	UAUCGAUGGUGAUA CCACG	+	198/199/200
0128			AACAAAATGGACTCC ACTGAGCC	CAAAAUGGACUCCACUG AG	CUCAGUGGAGUCCA UUUUG	+	201/202/203

0129	ise2c.pk001.d 16	Fator de alongamento	AATCCGTGACTAACCA AAAATGG	UCCGUGACUAAACCAAAA AU	AUUUUUGGUUAGUC ACGA	+	204/205/206
0130			AACATTGTCGTCAATTG GACACGT	CAUUGUCGUCAUUGGAC AC	GUGUCCAAUGACGA CAAUG	+	207/208/209
0131	ise2c.pk005.h 3	Fosfooligossacarídeo	AATTGTGAGACTGGT GGCCGAA	UUUGUGAGACUGGUGGC CG	CGGCCACAGUCUCA CAAA		421/422/423
0132			AATCTGATTGTATTCTG CCCCCTC	UCUGAUUGUAUUCGCC CC	GGGGCGAAUACAA UCAGA		424/425/426
0133			AACACTCTAGTTCTGC CTATTCT	CACUCUAGUUCUGCCUA UU	AAUAGGCAGAACUA GAGUG		427/428/429
0134	ise2c.pk001.d 21	Miosina	AACACACATCACAAT GGCGGATA	CACACAUCACAUAUGGCG GA	UCCGCCAUUGUGAU GUGUG		430/431/432
0135			AAGGATGGCATCATC GGCAAGAA	GGAUGGCAUCAUCGGCA AG	CUUGCCGAUGAUGC CAUCC		433/434/435
0136			AAAGGCTTCATCGAC ACCGCGAA	AGGCUUCAUCGACACCG CG	CGCGGUGUCGAUGA AGCCU		436/437/438
0137	ise2c.pk001.j 9	Miosina	AACTCCAAATTATAAC CTACTAG	ACUCCAAUUAUAAACCUA CU	AGUAGGUUAUAAUU GGAGU		210/211/212
0138			AAGTACAAGGATCTG ATCGGCAA	GUACAAGGAUCUGAUCG GC	GCCGAUCAGAUCU UGUAC		213/214/215
0139			AAGACTTCTTTCATGT GGCCCAT	GACUUUCUUAUGUGGC CC	GGCCACAUGAAGA AAGUC		216/217/218
0140	ise2c.pk002.f 12	Miosina	AAACAAAGTATCGCC TACACCGC	ACAAAGUAUCGCCUACA CC	GGUGUAGGCGAUAC UUUGU		439/440/441
0141			AATAGCTCGATCTTC AACGACT	UAGGUCGAUCUUAAC GA	UCGUUGAAGAUCGA CGCUA		442/443/444
0142	ise2c.pk001.b 14	Transportador de aminoácido no canal de potássio	AATCATAGAGCTTGA TGTGTGG	CUCAUAGAGCUUGAUGU GU	ACACAUCAAGCUCU AUGAG		219/220/221
0143			AAGATGTGGATGACG TCACTGGT	GAUGUGGAUGACGUCAC UG	CAGUGACGUCAUCC ACAUC	+	221/223/224
0144			AACCTTCTTGATTTCTC TTCTGTG	CCUUCUGAUUCUCUUC UG	CAGAAAGAGAAUCAG GAAGG	+	225/226/227
0145	ise2c.pk003.f 2	Potássio retificando internamente	AACAGTCTTGTGTATA AGTGAAC	CAGUGCUUGUGAUAAAGU GA	UCACUUAUCACAAG CACUG	+	228/229/230
0146			AAGTTAATGGTGACTG CCCTCGA	GUAAUUGGUGACUGCCC UC	GAGGGCAGUCACCA UUAAC	+	231/232/233
0147			AATAAGCGATGACG CCATAGGA	UAAAGCGAUGACCCCAU AG	CUAUGGGGUCAUCG CUUUA	+	234/235/236

0148	ise2c.pk005.l 20	Transportador de aminoácido	AAACGGTACTGCAGC AAAAAGAC	ACGGUACUGCAGCAAAA AG	CUUUUUGCUGCAGU ACCGU	+	237/238/239
0149			AAGCTGCATATCTT GGCTCTC	GCUGCAUACUUCUUGGC UC	GACCAAGAAAGUUA GCAGC	+	240/241/242
0150			AAATGTTTACAGAGA CGCGATGA	AUGUUUACAGAGACGCG AU	AUCGCGUCUCUGUA AACAU	+	243/244/245
0151	ise2c.pk001.d 1	tubulina	AACGTCGATCTTACCG AGTTCCA	CGUCGAUCUUACCGAGU UC	GAACUCGGUAAAGAU CGACG	+	246/247/248
0152	ise2c.pk001.k 6	tubulina	AATTCAAAATGCGTG AGTGCATC	UUCAAAAUUGCGUGAGUG CA	UGCACUCACGCAUU UUGAA	+	249/250/251
0153			AAATCGTAGACCTAGT CCTCGAC	AUCGUAGACCUAGUCCU CG	CGAGGACUAGGUCU ACGAU	+	252/253/254
0154	ise2c.pk001.l 2	tubulina	AAACTCAATTCAAAAT GCGTGAG	ACUCAAAUUCAAAAUGCG UG	CACGCAUUUUGAAU UGAGU	+	255/256/257
0155			AACTTATCACTGGTAA GGAAGAT	CUUAUCACUGGUAAAGGA AG	CUUCCUUACCAAGUG AUAAG		258/259/260
0156	ise2c.pk002.b 4	ubiquitina	AAGAGTTACGAACCG TCACCAT	GAGUACGAACCGUCAC CA	UGGUGACGGUUCGU AACUC	+	261/262/263
0157			AAACTTAGTCCGGATA ATGAACC	ACUAGUCCGGAUAAUG AAI	UUCAUUAUCCCGGAC UAAGU	+	264/265/266
0158			AAGCGGATGTACGAG AACCTGTT	GGCGAUGUACGAGAACC UG	CAGGUUCUCGUACA UCGCC	+	267/268/269
0159	ise2c.pk001.j 16	Ribonucleopr oteína nuclear pequena	AACGACAAGATGCTG AAGGAGAC	CGACAAGAUUGCUGAAGG AG	CUCCUUCAGCAUCU UGUCG	+	270/271/272
0160	ise2c.pk006.h 23	Ribonucleopr oteína nuclear pequena	AAGATAAAGGTGCGC TGTGGACC	GAUAAAAGGUGCGGUGUG GA	UCCACACGCGACCUU UAUC	+	273/274/275
0161			AATGTCAAGACTGATC CAAAACAC	UGUCAAGACUGAUCCAA AC	GUUUGGAUCAGUCU UGACA	+	276/277/278
0162			AACATTTCGAGTCTGAA CAGGTGG	CAUUCGAGUCUGAAACAG Gut	ACCUGUUCAGACUC GAAUG	+	279/280/281

Tabela 9 (Nota: a sequência de primer de RNA senso e as sequências de primer de RNA antisenso mostradas na tabela 9 foram geradas com 2 resíduos de timina na extremidade 3')

Amostra	seq id	gene id	Sequência alvo	dianteira	reversa	ppm			SEQ ID NO
						30	15	8	
0075			AAGTCTGCTGACGA GAACAAGGA	GGUCGUGACG AGAACAAG	CUUGUUCUGUCA GCGACC				51/52/53
0076			AAGTCTCTGGGCTT GAGTTCCA	GUGUCCUGGGC UUGAGUUC	GAACUCAAGCCCA GGACAC	+			54/55/56
0077	ise1c.pk0 03.f7	Investigação do hormônio juvenil	AAGAAGAACTCCT CCACGTGT	GAAGAAGCUCC UCCACGUG	CACGUGGAGGAGC UUCUUC				57/58/59
0078			AAGTCTGCTGACGA GAACAAGGA	GGUCGUGACG AGAACAAG	CUUGUUCUGUCA GCGACC				60/61/62
0079			AATGTCCTGGGGCT GAGTTTCAA	UGUCCUGGGC UGAGUUUC	GAACUCAGCCCC AGGACA				63/64/65
0080	ise1c.pk0 05.a15	Investigação do hormônio juvenil	AAGAATAAGCTCCT CCACGTGT	GAUAAGCUCC UCCACGUG	CACGUGGAGGAGC UUAUUC	+	+		66/67/68
0081			AATTTGTCGAGGAG ACCTATTG	UUUGUCGAGGA GACCCUUAU	AUAGGGUCUCCUC GACAAA				69/70/71
0082			AAGTCTGCGTTCACT CTTGAAGA	GUUCGCGUUCA CUCUUGAA	UUCAAGAGUGAA CGCGAAC	NT			72/73/74
0083	ise1c.pk0 06.d24	Investigação do hormônio juvenil	AACTGCCCTTAACC TCATCTAT	CUGCCCUUAAC CUCAUCUtt	AGAUGAGGUUAA GGGCGAG				75/76/77
0084			AATCACGCTGAAAC CACTGTATA	UCACGCUGAAA CCACUGUAtt	UACAGUGGUUUC AGCGUGA	+			78/79/80
0085	ise2c.pk0 09.i4	Investigação do hormônio juvenil	AAAATATGGCGCGC CTATTGTTT	AAUAUGGCGCG CCUAUUGU	ACAAUAGGCGCGC CAUAUU				81/82/83
0086			AACGTTCTCGGTCTT TCACTGCT	CGUUCUGGUC UUUCACUG	CAGUGAAAGACCG AGAACG				84/85/86
0087			AAGTCATCGTCCAA	GUCAUCGUUCC	GUAGACUUGGAA	+			87/88/89

			GTCTACCT	AAGUCUAC	CGAUGAC				
0088	ise2c.pk0 01.d19	Investigação vacuolar	AACCCCTTGAATGTT AAGGTGG	CCCCUUGAAUG UUAAGGUC	GACCUAACAUAUC AAGGG	+			90/91/92
0089			AAGTACACCATGTT GCAAGTATG	GUACACCAUGU UGCAAGUA	UACUUGCAACAUG GUGUAC				93/94/95
0090			AACGTGTCCATGAT GGCTGACTC	CGUGUCCAUGA UGGCUGAC	GUCAGCCAUAUG GACACG	NT			96/97/98
0091	ise2c.pk0 01.e14	Investigação vacuolar	AAACCTACAAAAATG GCCGAAAAAC	ACCUACAAAAU GGCCGAAA	UUUCGGCCAUAUU GUAGGU				99/100/101
0092			AATCTACGGACCCCTT CTTTGGAG	UCUACGGACCC UUCUUUGG	CCAAAGAAAGGGUC CGUAGA	--			102/103/104
0093	ise2c.pk0 01.f20	Investigação vacuolar	AACTCTGACGTCATC ATCTACGT	CUCUGACGUCA UCAUCUAC	GUAGAUGAUGAC GUCAGAG				105/106/107
0094			AAGTGCTTGGGTAA CCCCGACAG	GUGCUUGGGUA ACCCCGAC	GUCGGGGUUAACCC AAGCAC				108/109/110
0095			AACCTGGCTCATCTCC TACAGCAA	CUGGCUCAUCU CCUACAGC	GCUGAAGGAGAU GAGCCAG				111/112/113
0096	ise2c.pk0 10.h3	Investigação da caderina	AAACAGTGCCTCGT AATATATTC	ACAGUGCGUGC UAAUAUAU	AUAUAUAUCGAC GCACUGU				114/115/116
0097			AAGGCACATGGTCC TTCACCTGAT	GGCACAUGGUC CUUCACUG	CAGUGAAGGACCA UGUGCC				117/118/119
0098			AACACCATGACCCT CGTGTACAA	CACCAUGACCCU CGUGUAC	GUACACGAGGGUC AUGGUG	NT			120/121/122
0099	ise2c.pk0 07.k24	Proteína cuticular	AACGAGGCCGGATC TCTTAAGCA	CGAGGCCGGAU CUCUUAAG	CUUAAGAGAUCCG GCCUCG				123/124/125
0100			AACCTCACACATAA CTAGACAAA	CUUCACACADA ACUAGACA	UGUCUAGUUAUG UGUGAAG				457/458/459
0101			AATGCGTGCGGATTT CAAACTTA	UUAGAAAUUAU AAGCCAG	CUGGGCUUAUAA UUUCUAA				460/461/462
0102	ise2c.pk0 11.a10	Proteína cuticular	AAAAAACACAGACC ACGTTACAA	AAAACACAGAC CACGUUCA	UGAACGUGGUCU GUGUUUU				463/464/465
0103			AATCGATGTTGGTG TTATTCGCT	UCGAUGGUGGU GUUAUUCG	CGAAUAACACCAC CAUCGA	+			126/127/128
0104	ise2c.pk0 11.h12	Proteína cuticular	AAAGAAAATGCTAC GCGTTACGA	AGAAAAUGCUA CGCGUAC	GUAACGCGUAGCA UUUUUU				129/130/131

0105			AACCTTGGACACT ACTGGAAGA	CCCUUGGACAC UACUGGAA	UCCAGUAGUGUC CAAGG	+		132/133/134
0106			AAGATCCTATGTGT ACCAGGTT	GGAUCCUAUGU GUACCAGG	CCUGGUACACAUA GGAUCC	NT		135/136/137
0107	ise2c.pk0 01.d22	Fator de iniciação da caderina	AAACTCGGCACACA ACACAATGG	ACUCGGCACAC AACACAAU	AUUGUGUUGUGU GCCGAGU			138/139/140
0108			AATACGAAGATATC TGCCCTTCC	UACGAAGAUAU CUGCCCUU	AAGGCAGAUUAU CUUCGUA	+		141/142/143
0109			AATCAACAGCTCTTA CATAAATG	UCAACAGCUCU UACAUAUA	UUUAUGUAAGAG CUGUUGA	+		144/145/146
0110	ise2c.pk0 01.d9	Fator de iniciação da caderina	AAAGAAAGATCAGAA GATGGCCG	AGAAGAUCAGA AGAUUGGC	GCCAAUCUUCUGA UCUUCU			147/148/149
0111			AAAAGCCGTCTGCT ATCCAACAA	AAGCCGUCUCG UAUCCAAAC	GUUGGAUAGCAG ACGGCUU			150/151/152
0112			AATGCTAAATGCCA TGCTTGCAT	UGCUAUAUGCC AUGCUUGC	GCAAGCAUGGCAU UUAGCA	+		153/154/155
0113	ise2c.pk0 01.i23	Fator de iniciação da caderina	AAGATCAGAAAGATT GGCCGGAAG	GAUCAGAAAGAU UGGCCGGA	UCCGGCCAAUCUU CUGAUC	+		156/157/158
0114			AATCTTCAGCAAAT CGATACCA	UUCUUCAGCAA AUCGAUAC	GUAUCGAUUUGC UGAAGAA	NT		159/160/161
0115			AAATGCTGTCAAGA GGATTTAAA	AUGCUGUCAAG AGGAUUUA	UAAAUCCUCUUGA CAGCAU	+		162/163/164
0116	ise2c.pk0 01.i24	Fator de iniciação da caderina	AAGCTCGAGACTTG CTCTTGATG	GCUCGAGACUU GCUCUUGA	UCAAGAGCAAGUC UCGAGC	+		165/166/167
0117			AACTGTTAGCTCAA GGTCTGCTA	CUGUAGCUCUA AGGUCUGC	GCAGACCUUGAGC UAACAG	+		168/169/170
0118			AAGACTTCTATCAG AAITTGCG	GACUUUCUAUC AGAAUUUG	CAAAUUCUGAUA GAAAGUC			171/172/173
0119	ise2c.pk0 05.b9	Fator de iniciação da caderina	AAACTTAATCATGG ACGACGACA	ACUAAAUCAUG GACGACGA	UCGUCGUCCAUGA UUAAGU			174/175/176
0120			AAAGAAGAAGAAGA AGAAGGGAG	AGAAGAAGAAG AAGAAGGG	CCCUUCUUCUUCU UCUUCU	+		177/178/179

0121			AAGATCAAGAGAA GTCGAGGAT	GAUCAAGAGAA UGUCGAGG	CCUCGACAUCUC UUGAUC		+	+	+	180/181/182
0122	ise2c.pk0 02.m10	SAR1	AAAATCGTCGGTTT AGCGACGT	AAUCGUCGGUU UUAGCGAC	GUCGCUAAAACCG ACGAUU		NT			183/184/185
0123			AACTGTCAATAGGC AGTATGCGT	CUGUCAAUAGG CAGUAUGC	GCAUACUGCCUAU UGACAG		+			186/187/188
0124			AACCTGTACCAACA GACCACTGG	CCUGUACCAAC AGACCACTU	AGUGGUCUGUUG GUACAGG		+			189/190/191
0125	ise2c.pk0 01.c14	Fator de alongamento	AACCAAAAATGGGC AAGGAAAAG	CCAAAAUUGGG CAAGGAAA	UUUCCUUGCCCAU UUUUGG		+			192/193/194
0126			AACGTGTTATCACC ATCGATATT	CGUGUAUCAC CAUCGAUA	UAUCGAUGGUGA UACCACG		+			195/196/197
0127			AACAAAAATGGACTC CACTGAGCC	CAAAAUGGACU CCACUGAG	CUCAGUGGAGUCC AUUUUG		+			198/199/200
0128	ise2c.pk0 01.d16	Fator de alongamento	AATCCGTGACTAAC CAAAAATGG	UCCGUGACUAA CCAAAAAU	AUUUUUGGUUAG UCACGGA		-			201/202/203
0129			AACATTGTCTCATTT GGACACGT	CAUUGUCGUCA UUGGACAC	GUGUCCAAUGACG ACAAUG					204/205/206
0130	ise2c.pk0 05.h3	Fosfooligossacar ideo	AATTTGTGAGACTG GTGGCCGAA	UUUGAGAGACU GGUGGCCG	CGGCCACAGUCU CACAAA		NT			207/208/209
0131			AATCTGATTGTATTTC GCCCCCTC	UCUGAUUGUAU UCGCCCCC	GGGGCGAAUAC AAUCAGA					421/422/423
0132			AACACTCTAGTTCTG CCTATTCT	CACUCUAGUUC UGCCUAUU	AAUAGGCAGAAC UAGAGUG					424/425/426
0133	ise2c.pk0 01.d21	Miosina	AACACACATCACAA TGCGCGATA	CACACAUCACA AUGGCCGA	UCCGCCAUUGUGA UGUGUG					427/428/429
0134			AAGGATGGCATCAT CGGCAAGAA	GGAUGGCAUCA UCGGCAAG	CUUGCCGAUGAUG CCAUC					430/431/432
0135			AAAGGCTTCATCGA CACCGCGAA	AGGCUUCAUCG ACACCGCG	CGCGGUGUCGAUG AAGCCU					433/434/435
0136	ise2c.pk0 01.j9	Miosina	AAACTCCAAATTATA ACCTACTAG	ACUCCAAUUUAU AACCUCU	AGUAGGUUAUAA UUGGAGU					436/437/438
0137			AAGTACAAGGATCT GATCGGCAA	GUACAAGGAUC UGAUCGGC	GCCGAUCAGAUCC UUGUAC					210/211/212

0138			AAGACTTCTTTCATG TGGCCCAT	GACUUUCUUA UGUGGCC	GGCCACAUGAAG AAAGUC	NT		213/214/215
0139	ise2c.pk0 02.f12	Miosina	AAACAAAAGTATCGC CTACACCGC	ACAAAGUAUCG CCUACACC	GGUGUAGGCGAU ACUUUGU			216/217/218
0140			AATAGCGTCGATCTT CAACGACT	UAGCGUCGADC UUCAACGA	UCGUUGAAGADC GACGCUA			439/440/441
0141	ise2c.pk0 01.b14	Transportador de aminoácido no canal de potássio	AACTCATAGAGCTT GATGTGTGG	CUCAUAGAGCU UGAUGUGU	ACACAUAAGCUC UAUGAG			442/443/444
0142			AAGATGTGGATGAC GTCACCTGGT	GAUGUGGAUGA CGUCACUG	CAGUGACGUCAC CACACUC			219/220/221
0143			AACCTTCTGTATTCT CTTCTGTG	CCUCCUGAUU CUCUUCUG	CAGAAAGAGAAC AGGAAGG	+		222/223/224
0144	ise2c.pk0 03.f2	Potássio retificando internamente	AACAGTGCTTGTGAT AAGTGAAC	CAGUGCUUGUG AUAAGUGA	UCACUUAUCACAA GCACUG	+	+	225/226/227
0145			AAGTTAATGGTGAC TGCCCTCGA	GUUAAUGGUGA CUGCCCCUC	GAGGGCAGUCACC AUUAAC	+		228/229/230
0146			AATAAAGCGATGAC CCCATAGGA	UAAAGCGAUGA CCCCAUAG	CUAUGGGGUCAC GCUUUA	NT		231/232/233
0147	ise2c.pk0 05.l20	Transportador de aminoácido	AAACGGTACTGCAG CAAAAAGAC	ACGGUACUGCA GCAAAAAG	CUUUUUGCUGCAG UACCGU	+		234/235/236
0148			AAGCTGCATACTTCT TGGCTCTC	GCUGCAUACUU CUUGGCUC	GAGCCAAGAAAGU AUGCAGC			237/238/239
0149			AAATGTTTACAGAG ACGCGATGA	AUGUUUACAGA GACGCGAU	AUCGCGUCUCUGU AAACAU	+		240/241/242
0150	ise2c.pk0 01.d1	tubulina	AACGTCGATCTTACC GAGTTCCA	CGUCGAUCUUA CCGAGUUC	GAACUCGGUAAG AUCGACG	+	+	243/244/245
0151	ise2c.pk0 01.k6	tubulina	AATTCAAAATGCGT GAGTGCAIC	UUCAAAAUGCG UGAGUGCA	UGCACUCACGCAU UUUGAA	+		246/247/248
0152			AAATCGTAGACCTA GTCCTCGAC	AUCGUAGACCU AGUCCUCG	CGAGGACUAGGUC UACGAU	+	+	249/250/251
0153	ise2c.pk0 01.l2	tubulina	AAACTCAATTCAAA ATGCGTGAG	ACUCAAUUCAA AAUGCGUG	CACGCAUUUUUAA UUGAGU	+	+	252/253/254
0154			AACCTATCACTGGTA AGGAAGAT	CUUAUCACUGG UAAGGAAG	CUUCCUUAACCAGU GAUAAG	NT		255/256/257

0155	ise2c.pk0 02.b4	ubiquitina	AAGAGTTACGAACC GTCACCATA	GAGUACGAAC CGUACCA	UGGUGACGGUUC GUAAUCUC	+			258/259/260
0156			AAACTTAGTCCGGA TAATGAACC	ACUAGUCCGG AUAAUGAA	UUCAUUAUCCGGA CUAAGU	+	+		261/262/263
0157			AAGGCGATGTACGA GAACCTGTT	GGCGAUGUACG AGAACCUG	CAGGUUCUCGUAC AUCGCC	+			264/265/266
0158	ise2c.pk0 01.j16	Ribonucleoproteí na nuclear pequena	AACGACAAGATGCT GAAGGAGAC	CGACAAGAUGC UGAAGGAG	CUCCUUCAGCAUC UUGUCG	+			267/268/269
0159	ise2c.pk0 06.h23	Ribonucleoproteí na nuclear pequena	AAGATAAAGGTGCG GTGTGGACC	GAUAAAGGUCG CGUGUGGA	UCCACACGGGACC UUUAUC	+			270/271/272
0160			AATGTCAAGACTGA TCCAAACAC	UGUCAAGACUG AUCCAAAC	GUUUGGAUCAGU CUUGACA	+			273/274/275
0161			AACATTCGAGTCTG AACAGGTGG	CAUUCGAGUCU GAACAGGU	ACCUGUUCAGACU CGAAUG	+	+		276/277/278

Tabela 10

Placa	seq.i.d.	intestino	gene id	Mortalidade por injeção (%)	Resultados da alimentação por gota	Ensaio tópico 1 30 ppm	Ensaio tópico 2 30 ppm	Ensaio tópico 3 30 ppm	Ensaio tópico 4 30 ppm	Ensaio tópico 4 15 ppm	Ensaio tópico 4 8 ppm	Top. 5 15 ppm	Top. 5 8 ppm
77	ise1c.pk002.m13	não	Investigação do hormônio juvenil	NT	NT	NT	-	-	+			+	
81	ise1c.pk005.a15	não	Investigação do hormônio juvenil	NT	NT	NT	-	-	+	+		+	
114	ise2c.pk001.i23	não	Fator de iniciação da tradução	NT	NT	NT	+	+	+			+	
122	ise2c.pk005.b9	Sim	Fator de iniciação da tradução	NT	NT	NT	+	+	+	+	+	+	+
143	ise2c.pk001.b14	não	Transportador de aminoácido no canal de potássio	NT	NT	NT	-	+				+	
145	ise2c.pk003.f2	Sim	Potássio retificando internamente	NT	NT	NT	+	+	+	+		+	
146	ise2c.pk003.f2	Sim	Potássio retificando internamente	NT	NT	NT	+	+	+			+	
149	ise2c.pk005.l20	Sim	Transporte dependente de sódio hipotético	NT	NT	NT	+	+				+	
151	ise2c.pk001.d1	não	alfa tubulina	NT	NT	NT	+	+	+	+		+	
154	ise2c.pk001.l2	não	alfa tubulina	NT	NT	NT	+	+	+	+		+	

157	ise2c.pk002.b 4	sim	Provável ubiquitina- proteína ligase	NT	NT	NT	+	+	+	+	+	+
158	ise2c.pk002.b 4	sim	Provável ubiquitina- proteína ligase	NT	NT	NT	+	-	+	+	+	+
162	ise2c.pk006.h 23	sim	Proteína de ligação do RNA	NT	NT	NT	+	+	+	+	+	+

Tabela 11

DsRNA#	gene id	seqID	Comentário	8 ppm	4 ppm	2 ppm
0163	Proteína de ligação pre-mRNA	ise2c.pk006.m8	Placa 2 A1			
0164	Proteína de ligação pre-mRNA	ise2c.pk006.m8	Placa 2 B1			
0165	Proteína de ligação pre-mRNA	ise2c.pk006.m8	Placa 2 C1			
0166	Proteína de ligação pre-mRNA	ise2c.pk006.m8	Placa 2 D1	S		
0167	Proteína de ligação pre-mRNA	ise2c.pk006.m8	Placa 2 E1	S		
0168	Tipo quimotripsina; protease	ise2c.pk001.a23	Placa 2 F1	S		
0169	Tipo quimotripsina; protease	ise2c.pk001.a23	Placa 2 G1			
0170	Tipo quimotripsina; protease	ise2c.pk001.a23	Placa 2 H1			
0171	Tipo quimotripsina; protease	ise2c.pk001.a23	Placa 2 A2	S		
0172	Tipo quimotripsina; protease	ise2c.pk001.a23	Placa 2 B2	S		
0173	Tipo quimotripsina; protease	ise2c.pk001.a7	Placa 2 C2	S		
0174	Tipo quimotripsina; protease	ise2c.pk001.a7	Placa 2 D2			
0175	quimotripsinogênio; protease	ise2c.pk001.a7	Placa 2 E2			
0176	quimotripsinogênio; protease	ise2c.pk001.a7	Placa 2 F2			
0177	quimotripsinogênio; protease	ise2c.pk001.a7	Placa 2 G2			
0178	actina-depolimerização	ise2c.pk004.c4	Placa 2 H2			
0179	actina-depolimerização	ise2c.pk004.c4	Placa 2 A3			
0180	actina-depolimerização	ise2c.pk004.c4	Placa 2 B3			
0181	actina-depolimerização	ise2c.pk004.c4	Placa 2 C3			
0182	actina-depolimerização	ise2c.pk004.c4	Placa 2 D3			
0183	Fator de depolimerização da actina	ise2c.pk004.l4	Placa 2 E3			

0184	Fator de depolimerização da actina	ise2c.pk004.l4	Placa 2 F3			
0185	Fator de depolimerização da actina	ise2c.pk004.l4	Placa 2 G3			
0186	Fator de depolimerização da actina	ise2c.pk004.l4	Placa 2 H3			
0187	Fator de depolimerização da actina	ise2c.pk004.l4	Placa 2 A4			
0188	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	Placa 2 B4			
0189	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	Placa 2 C4			
0190	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	Placa 2 D4			
0191	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	Placa 2 E4			
0192	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	Placa 2 F4			
0193	superóxido dismutase	ise2c.pk005.f21	Placa 2 G4			
0194	superóxido dismutase	ise2c.pk005.f21	Placa 2 H4			
0195	superóxido dismutase	ise2c.pk005.f21	Placa 2 A5			
0196	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	Placa 2 B5			
0197	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	Placa 2 C5			
0198	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	Placa 2 D5			
0199	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	Placa 2 E5			
0200	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	Placa 2 F5			
0201	ecdisona oxidase	ise2c.pk001.c18	Placa 2 G5			
0202	ecdisona oxidase	ise2c.pk001.c18	Placa 2 H5			
0203	ecdisona oxidase	ise2c.pk001.c18	Placa 2 A6			
0204	inexina-2	ise2c.pk004.p1	Placa 2 B6			
0205	inexina-2	ise2c.pk004.p1	Placa 2 C6			
0206	inexina-2	ise2c.pk004.p1	Placa 2 D6			
0207	inexina-2	ise2c.pk004.p1	Placa 2 E6			
0208	inexina-2	ise2c.pk004.p1	Placa 2 F6			

Tabela 12

DsRNA#	gene id	seqID	Comentário	16ppm	8ppm	4ppm
0163	Proteína de ligação pre-mRNA	ise2c.pk006.m8	Placa 2 A1	S		
0164	Proteína de ligação pre-mRNA	ise2c.pk006.m8	Placa 2 B1	S		
0165	Proteína de ligação pre-mRNA	ise2c.pk006.m8	Placa 2 C1	S		
0166	Proteína de ligação pre-mRNA	ise2c.pk006.m8	Placa 2 D1	S		
0167	Proteína de ligação pre-mRNA	ise2c.pk006.m8	Placa 2 E1	S		

0168	Tipo quimotripsina; protease	ise2c.pk001.a23	Placa 2 F1	ss	S
0169	Tipo quimotripsina; protease	ise2c.pk001.a23	Placa 2 G1	ss	
0170	Tipo quimotripsina; protease	ise2c.pk001.a23	Placa 2 H1		
0171	Tipo quimotripsina; protease	ise2c.pk001.a23	Placa 2 A2		
0172	Tipo quimotripsina; protease	ise2c.pk001.a23	Placa 2 B2		
0173	quimotripsinogênio; protease	ise2c.pk001.a7	Placa 2 C2	ss	
0174	quimotripsinogênio; protease	ise2c.pk001.a7	Placa 2 D2	S	
0175	quimotripsinogênio; protease	ise2c.pk001.a7	Placa 2 E2	S	
0176	quimotripsinogênio; protease	ise2c.pk001.a7	Placa 2 F2	S	
0177	quimotripsinogênio; protease	ise2c.pk001.a7	Placa 2 G2	S	
0178	actina-depolimerização	ise2c.pk004.c4	Placa 2 H2		
0179	actina-depolimerização	ise2c.pk004.c4	Placa 2 A3	ss	
0180	actina-depolimerização	ise2c.pk004.c4	Placa 2 B3	s	
0181	actina-depolimerização	ise2c.pk004.c4	Placa 2 C3		
0182	actina-depolimerização	ise2c.pk004.c4	Placa 2 D3		
0183	Fator de depolimerização da actina	ise2c.pk004.l4	Placa 2 E3		
0184	Fator de depolimerização da actina	ise2c.pk004.l4	Placa 2 F3		
0185	Fator de depolimerização da actina	ise2c.pk004.l4	Placa 2 G3		
0186	Fator de depolimerização da actina	ise2c.pk004.l4	Placa 2 H3		
0187	Fator de depolimerização da actina	ise2c.pk004.l4	Placa 2 A4		
0188	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	Placa 2 B4		
0189	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	Placa 2 C4	s	
0190	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	Placa 2 D4		
0191	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	Placa 2 E4		
0192	dismutase; superóxido	ise2c.pk004.n19	Placa 2 F4	s	
0193	superóxido dismutase	ise2c.pk005.f21	Placa 2 G4		
0194	superóxido dismutase	ise2c.pk005.f21	Placa 2 H4		
0195	superóxido dismutase	ise2c.pk005.f21	Placa 2 A5		
0196	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	Placa 2 B5		
0197	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	Placa 2 C5		

0198	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	Placa 2 D5			
0199	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	Placa 2 E5			
0200	adenilato quinase isozima 3	ise2c.pk010.h5	Placa 2 F5			
0201	ecdisona oxidase	ise2c.pk001.c18	Placa 2 G5			
0202	ecdisona oxidase	ise2c.pk001.c18	Placa 2 H5			
0203	ecdisona oxidase	ise2c.pk001.c18	Placa 2 A6			
0204	inexina-2	ise2c.pk004.p1	Placa 2 B6			
0205	inexina-2	ise2c.pk004.p1	Placa 2 C6			
0206	inexina-2	ise2c.pk004.p1	Placa 2 D6			
0207	inexina-2	ise2c.pk004.p1	Placa 2 E6			
0208	inexina-2	ise2c.pk004.p1	Placa 2 F6			

Tabela 13. Resumo dos dados da alimentação por gotas FAW para a primeira série de primers de dsRNA sintéticos

			Ensaio #1 (tabela 6)		Ensaio #2 (tabela 7)		Ensaio #3 (tabela 8)		Ensaio #4 (tabela 8)		
			30 ppm		30 ppm		30 ppm		30 ppm	15 ppm	8 ppm
0075	ise1c.pk002.m13	Investigação do hormônio juvenil	-		-		-		NT	-	-
0076			NT		-		-		-	-	-
0077			NT		-		-		+	-	-
0078	ise1c.pk003.f7	Investigação do hormônio juvenil	NT		-		-		-	-	-
0079			NT		-		-		-	-	-
0080			NT		-		+		-	-	-
0081	ise1c.pk005.a15	Investigação do hormônio juvenil	NT		-		-		+	+	-
0082			NT		-		-		-	-	-
0083			+		+		NT		NT	-	-
0084	ise1c.pk006.d24	Investigação do hormônio juvenil	NT		-		+		-	-	-
0085			+		-		-		+	-	-
0086	ise2c.pk009.i4	Investigação do hormônio juvenil	-		-		-		-	-	-
0087			NT		-		-		-	-	-
0088			+		-		-		+	-	-
0089	ise2c.pk001.d19	Investigação vacuolar	+		-		+		+	-	-
0090			NT		-		-		-	-	-
0091			+		-		+		NT	-	-
0092	ise2c.pk001.e14	Investigação vacuolar	NT		-		-		-	-	-
0093			NT		-		-		+	-	-
0094	ise2c.pk001.f20	Investigação vacuolar	+		-		-		-	-	-
0095			+		-		-		-	-	-
0096			NT		-		-		-	-	-

0097	ise2c.pk010.h3	Investigação da caderina	NT	-	-	-	-	-	-
0098			NT	+	-	-	-	-	-
0099			NT	-	-	-	NT	-	-
0100	ise2c.pk007.k24	Proteína cuticular	NT	-	-	-	-	-	-
0101			NT	-	-	-	-	-	-
0102			NT	-	-	-	-	-	-
0103	ise2c.pk011.a10	Proteína cuticular	NT	+	-	-	-	-	-
0104			NT	+	+	+	+	+	-
0105	ise2c.pk011.h12	Proteína cuticular	NT	-	-	-	-	-	-
0106			NT	+	-	-	+	-	-
0107			+	-	-	-	NT	-	-
0108	ise2c.pk001.d22	Fator de iniciação de tradução	NT	-	+	+	-	-	-
0109			NT	+	+	+	+	+	-
0110			NT	-	-	+	+	+	-
0111	ise2c.pk001.d9	Fator de iniciação de tradução	NT	-	-	-	-	-	-
0112			NT	+	-	-	-	-	-
0113			NT	-	-	+	+	+	-
0114	ise2c.pk001.i23	Fator de iniciação de tradução	NT	+	+	+	+	+	-
0115			-	-	-	NT	NT	-	-
0116			NT	-	-	-	+	-	-
0117	ise2c.pk001.l24	Fator de iniciação de tradução	NT	-	-	+	+	+	-
0118			NT	-	-	+	+	+	-
0119			NT	+	-	-	-	-	-
0120	ise2c.pk005.b9	Fator de iniciação de tradução	NT	-	-	-	-	-	-
0121			NT	+	+	+	+	+	-
0122			NT	+	+	+	+	+	+
0123	ise2c.pk002.m10	SARI	-	-	-	+	NT	-	-
0124			NT	-	-	+	+	+	-
0125			NT	+	+	+	+	+	-

0126	ise2c.pk001.c14	Fator de alongamento	NT	+	+	+	+	-	-
0127			NT	+	+	+	+	-	-
0128			NT	-	+	+	+	-	-
0129	ise2c.pk001.d16	Fator de alongamento	NT	+	+	+	+	-	-
0130			NT	-	+	+	+	-	-
0131	ise2c.pk005.h3	Fosfooligossacarídeo	-	-	-	-	NT	-	-
0132			NT	-	-	-	-	-	-
0133			NT	-	-	-	-	-	-
0134	ise2c.pk001.d21	Miosina	NT	-	-	-	-	-	-
0135			NT	-	-	-	-	-	-
0136			NT	-	-	-	-	-	-
0137	ise2c.pk001.j9	Miosina	NT	-	-	-	-	-	-
0138			NT	+	-	-	-	-	-
0139			-	-	-	-	NT	-	-
0140	ise2c.pk002.f12	Miosina	NT	-	-	-	-	-	-
0141			NT	-	-	-	-	-	-
0142		Transportador de aminoácido no canal de potássio	NT	-	-	-	-	-	-
0143	ise2c.pk001.b14		NT	-	-	+	-	-	-
0144			NT	-	-	+	+	-	-
0145	ise2c.pk003.f2	Potássio retificando internamente	NT	+	+	+	+	+	-
0146			NT	+	+	+	+	-	-
0147			+	+	+	+	NT	-	-
0148	ise2c.pk005.120	Transportador de aminoácido	NT	+	+	+	+	-	-
0149			NT	+	+	+	-	-	-
0150			NT	-	+	+	+	-	-
0151	ise2c.pk001.d1	tubulina	NT	+	+	+	+	+	-
0152	ise2c.pk001.k6	tubulina	NT	-	-	-	+	-	-
0153			NT	+	+	+	+	+	-

0154	ise2c.pk001.i12	tubulina	NT	+	+	+	+	+	-
0155			-	-	-	-	NT	-	-
0156	ise2c.pk002.b4	ubiquitina	NT	-	+	+	+	-	-
0157			NT	+	+	+	+	+	-
0158			NT	+	+	+	+	-	-
0159	ise2c.pk001.j16	Ribonucleoproteína nuclear pequena	NT	+	+	+	+	-	-
0160	ise2c.pk006.h23	Ribonucleoproteína nuclear pequena	NT	-	+	+	+	-	-
0161			NT	-	+	+	+	-	-
0162			NT	+	+	+	+	+	-



Exemplo 2. Transformação de Milho

Embriões imaturos de milho de plantas doadoras de casa de estufa são bombardeados com um plasmídio contendo o elemento de silenciamento da invenção operacionalmente ligado a qualquer tecido determinado, tecido seletivo, ou promotor constitutivo e o gene marcador selecionável PAT (Wohlleben et al. (1988), Gene 70: 25-37), que confere resistência ao herbicida Bialaphos. Em uma concretização, as construções terão dois segmentos idênticos 2-300bp do gene alvo em orientações opostas com um segmento "intron" entre elas agindo como uma alça de grampo. Essa construção pode ser ligada ao promotor DMMB. Alternativamente, o gene marcador de seleção está previsto em um plasmídeo separado. A transformação é realizada da forma que se segue. Receitas dos meios seguem abaixo.

Preparação do tecido alvo

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

Um vetor de plasmídeo que inclui o elemento de silenciamento de interesse operacionalmente ligado a qualquer tecido específico, tecido seletivo, ou promotor constitutivo é feito. Este plasmídeo de DNA mais o plasmídeo de DNA contendo um marcador selecionável PAT é precipitado em 1,1 μ m (diâmetro médio) de pellets de tungstênio usando um procedimento de precipitação de CaCl_2 como segue: 100 μ l de partículas de tungstênio preparadas em água, 10 μ L (1 μ g) de DNA em tampão Tris EDTA (um DNA

total de 1 µg), 100 µl 2,5 M de CaCl₂ e, 10 µL de espermidina a 0,1 M.

Cada reagente é adicionado sequencialmente para a suspensão de partículas de tungstênio, enquanto mantidos no vortexer Multitubo. A mistura final é sonicada rapidamente e permitida a incubar no vórtice constante por 10 minutos. Após o período de precipitação, os tubos são centrifugados brevemente, o líquido retirado, lavado com 500 mL de etanol 100%, e centrifugado por 30 segundos. Novamente o líquido é removido, e 105 µL de etanol a 100% é adicionado ao sedimento de partículas de tungstênio final. Para bombardeio de arma de partículas, as partículas de DNA/tungstênio são brevemente sonicadas e 10 µL manchadas no centro de cada macrotransportador e secas por cerca de 2 minutos antes do bombardeamento.

As placas de amostra são bombardeadas no nível # 4 em uma arma de partículas. Todas as amostras recebem um tiro de 650 PSI, com um total de dez alíquotas retiradas de cada tubo de partículas preparadas/DNA.

Após o bombardeamento, os embriões são mantidos em meio 560Y por dois dias, em seguida, transferidos para meio de seleção 560R contendo 3 mg/litro de Bialaphos e subcultivados a cada duas semanas. Após aproximadamente 10 semanas de seleção, clones de calos resistentes a seleção são transferidos para meio 288J para iniciar a regeneração de plantas. Após a maturação de embriões somáticos (2-4 semanas), embriões somáticos bem desenvolvidos são transferidos para o meio para a germinação e transferidos para a sala de cultura iluminada. Aproximadamente 7-10 dias depois, plântulas em desenvolvimento são transferidas para meio livre de hormônio 272V em tubos por 7-10 dias até as mudas estarem bem estabelecidas. As plantas são então transferidas para inserções em vasos (equivalentes a vaso de 2,5"), contendo solo de cultivo e cultivadas por uma

semana em uma câmara de crescimento, e posteriormente cultivadas por 1-2 semanas adicionais em casa de vegetação, em seguida, transferidas para vasos 600 clássicos (1,6 galão; 6,06 litros) e cultivadas para a maturidade.

5 Plantas são monitoradas e marcadas para o marcador adequado, como o controle de lepidópteros e têm atividade inseticida. Por exemplo, um ensaio de alimentação FAW pode ser pré-formado. Em tais ensaios, discos de folhas das plantas transgênicas são retirados com uma broca de um
10 centímetro de cortiça ou folha. Seis discos de folhas são preparados para cada planta. As folhas são colocadas em uma placa de microtitulação 24 em cima de 500 μ l de 0,8% de ágar. Cada disco foliar é infestado com 2 lagartas-do-cartucho recém-eclodidas e, em seguida, a placa é selada
15 com mylar. Um pequeno buraco de ventilação é feito para cada poço e as placas são então armazenadas em câmara de crescimento 28C. O ensaio é pontuado para mortalidade, desnutrição e consumo foliar em 96 horas.

Meio de bombardeamento (560Y) compreende 4,0 g/L de
20 sais basais N6 (SIGMA C-1416), 1,0 mL/L de Mix de vitamina Eriksson (1000X SIGMA-1511), 0,5 mg/L de tiamina HCl, 120,0 g/L de sacarose, 1,0 mg/L 2,4-D, e 2,88 g/L L-prolina (trazido o volume com DI H₂O de ajuste após o pH 5,8 com KOH), 2,0 g/L de Gelrite (adicionado depois de levar o
25 volume com DI H₂O) e 8.5 mg/L de nitrato de prata (adicionados após a esterilização do meio e resfriamento a temperatura ambiente). Meios de seleção (560R) compreendem 4,0 g/L de sais basais N6 (SIGMA C-1416), 1,0 mL/L de Mix de vitamina Eriksson (1000X SIGMA-1511), 0,5 mg/L de
30 tiamina HCl, 30,0 g/L de sacarose e 2,0 mg/L 2,4-D (trazido o volume com DI H₂O de ajuste após o pH 5,8 com KOH), 3,0 g/L de Gelrite (adicionado depois de levar o volume com DI H₂O) e 0,85 mg/L de nitrato de prata e 3,0 mg/L de

bialaphos (ambos adicionados após a esterilização do meio e resfriamento a temperatura ambiente).

Meio de regeneração vegetal (288J) compreende 4,3 g/L de sais MS (GIBCO 11117-074), 5,0 mL/L de solução de
 5 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 trazida ao volume com DI H 2 O polido) (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
 10 mL/L de 0,1 mM de ácido abscísico (trazido ao volume com DI H 2 O polido, após ajuste de pH 5,6), 3,0 g/L de Gelrite (adicionado depois de levar ao volume com DI H 2 O) e 1,0 mg/L de ácido indolacético e 3,0 mg/L de bialaphos (adicionados após a esterilização do meio e resfriamento a
 15 60 ° C). Meio livre de hormônio (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 trazida ao volume com DI H 2 O polido), 0,1 g/L de
 20 mio-inositol, e 40,0 g/L de sacarose (trazido ao volume com DI H 2 O polido, após ajuste de pH para 5,6) e 6 g/L de Bacto-agar (adicionado depois de levar ao volume com DI H 2 O polido), esterilizado e resfriado a 60 ° C.

25 Exemplo 3 Transformação de Milho mediada por *Agrobacterium*

Para a transformação de milho mediada por *Agrobacterium* com um elemento de silenciamento da invenção, o método de Zhao é empregado (Patente US No. 5.981.840, e Publicação de Patente PCT WO98/32326, o conteúdo das quais
 30 são incorporadas por referência). Tal como uma construção pode incluir dois segmentos de 2-300bp idênticos ao gene alvo em orientações opostas com um segmento "intron" entre eles agindo como uma alça de grampo. Essa construção pode ser ligada ao promotor dMMB. Resumidamente, embriões

imaturos são isolados de milho e os embriões são postos em contato com uma suspensão de *Agrobacterium*, onde as bactérias são capazes de transferir o polinucleotídeo compreendendo o elemento de silenciamento a pelo menos uma
5 célula de pelo menos um dos embriões imaturos (etapa 1: a etapa de infecção). Nesta etapa, os embriões imaturos são imersos em uma suspensão de *Agrobacterium* para o início da inoculação. Os embriões são co-cultivados por um tempo com a *Agrobacterium* (etapa 2: a etapa de co-cultivo). Os
10 embriões imaturos são cultivados em meio sólido após a etapa de infecção. Após este período de co-cultivo uma etapa opcional de "repouso" é contemplada. Nesta etapa de repouso, os embriões são incubados na presença de pelo menos um antibiótico que inibe o crescimento de
15 *Agrobacterium*, sem a adição de um agente seletivo de plantas transformantes (etapa 3: etapa de repouso). Os embriões imaturos são cultivados em meio sólido com antibiótico, mas sem um agente de seleção, para a eliminação de *Agrobacterium* e por uma fase de repouso para
20 as células infectadas. Em seguida, os embriões inoculados são cultivados em meio contendo um agente seletivo e o calo transformado crescido é recuperado (etapa 4: a etapa de seleção). Os embriões imaturos são cultivados em meio sólido com um agente seletivo resultando no crescimento
25 seletivo de células transformadas. O calo é então regenerado em plantas (etapa 5: a etapa de regeneração), e os calos cultivados em meio seletivo são cultivados em meio sólido para regenerar as plantas.

30 Exemplo 4: Transformação de embriões de soja
Condições de Cultura

Culturas em suspensão embriogênica de soja (cv. Jack) são mantidas em 35 mL de meio líquido SB196 (veja receitas abaixo) em agitador rotativo, a 150 rpm, 26 °C com luz

fluorescente branca fria em um fotoperíodo de 16:8 hr dia/noite na intensidade da luz de 60-85 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. As culturas são repicadas a cada 7 dias por duas semanas pela inoculação de aproximadamente 35 mg de tecido em 35 mL de líquido fresco SB196 (o intervalo de subcultura preferido é a cada 7 dias).

Culturas em suspensão embriogênica de soja são transformadas com os plasmídeos e fragmentos de DNA descritos nos exemplos acima pelo método de bombardeamento por arma de partículas (Klein et al. (1987) Nature, 327:70).

Iniciação da Cultura de Suspensões Embriogênicas de Soja

Culturas de soja são iniciadas duas vezes por mês, com 5-7 dias entre cada início.

Vagens com sementes imaturas de plantas de soja disponíveis 45-55 dias após o plantio são escolhidas, retiradas de suas conchas e colocadas em uma caixa magenta esterilizada. As sementes de soja são esterilizadas agitando-as durante 15 minutos em uma solução de Clorox a 5% com uma gota de sabonete Ivory (95 mL de água destilada autoclavada mais 5 mL de Clorox e 1 gota de sabão). Misture bem. Sementes são lavadas com 2 garrafas de 1 litro de água destilada estéril e aquelas com menos de 4 mm são colocadas em lâminas de microscopia individual. A pequena extremidade das sementes é cortada e os cotilédones pressionados para fora do tegumento. Os cotilédones são transferidos para placas contendo meio SB1 (25-30 cotilédones por placa). Placas são embaladas com fita de fibra e armazenadas por oito semanas. Após este tempo embriões secundários são cortados e colocados em meio líquido SB196 por 7 dias.

Preparação do DNA para o bombardeamento

Ou um plasmídeo intacto ou um fragmento de plasmídeo de DNA contendo os genes de interesse e o gene marcador de seleção são usados para o bombardeamento. DNAs plasmidiais para bombardeamento são rotineiramente preparados e purificados utilizando o método descrito no Promega TM Protocols and Applications Guide, Segunda Edição (página 106). Fragmentos dos plasmídeos carregando o elemento de silenciamento de interesse são obtidos pelo isolamento de gel dos dois plasmídeos digeridos. Em cada caso, 100 µg de DNA plasmidial é digerido em 0,5 mL da mistura de enzima específica que é apropriada para o plasmídeo de interesse. Os fragmentos de DNA resultantes são separados por eletroforese em gel em 1% de agarose GTG SeaPlaque (Molecular BioWhitaker Applications) e os fragmentos de DNA que contêm o elemento de silenciamento de interesse são cortados do gel de agarose. DNA é purificado a partir da agarose usando a enzima digestiva GELase seguindo o protocolo do fabricante.

Uma alíquota de 50 µL de água destilada estéril, contendo 3 mg de partículas de ouro (3 mg de ouro) é adicionada a 5 µL de 1 µg/µL de solução de DNA (ou plasmídeo intacto ou fragmento de DNA preparado como descrito acima), 50 µL 2.5M CaCl₂ e 20 µL a 0,1 M de espermidina. A mistura é agitada por 3 min no nível 3 de um agitador vortex e girada por 10 segundos em uma microcentrífuga de bancada. Depois de uma lavagem com 400 µL de etanol a 100% o sedimento é suspenso por ultra-som em 40 µL de etanol a 100%. Cinco µL de suspensão de DNA são dispensados a cada disco voador do instrumento de disco Biolistic PDS1000/HE. Cada alíquota de 5 µL contém aproximadamente 0,375 mg de ouro por bombardeamento (ou seja, por disco).

Preparação do tecido e bombardeamento com DNA

Cerca de 150-200 mg de 7 dias de idade de culturas em suspensão embrionárias são colocados em uma placa de petri vazia, estéril de 60 x 15 mm e a placa coberta com tela de plástico. Tecido é bombardeado com um ou dois tiros por placa com pressão de ruptura da membrana fixada em 1100 PSI e a câmara evacuada a um vácuo de 27-28 polegadas de mercúrio. O tecido é colocado em cerca de 3,5 centímetros da tela de retenção/parada.

10

Seleção de embriões transformados

Embriões transformados foram selecionados utilizando higromicina (quando a higromicina fosfotransferase, HPT, o gene foi usado como marcador de seleção) ou clorsulfuron (quando a acetolactato sintase, ALS, o gene foi utilizado como marcador selecionável).

15

Seleção de Higromicina (HPT)

Após o bombardeamento, o tecido é colocado em um meio novo SB196 e cultivado como descrito acima. Seis dias após o bombardeamento, o SB196 é trocado com SB196 fresco contendo um agente de seleção de 30 mg/L de higromicina. O meio de seleção é atualizado semanalmente. Quatro a seis semanas após a seleção, o tecido verde, transformado pode ser observado crescendo a partir dos clusters embriogênicos necróticos, não transformados. Tecido verde, isolado, é removido e inoculado em placas de microtitulação para gerar novas culturas em suspensão embriogênicas transformadas, clonalmente propagadas.

25

30

Seleção de Clorsulfuron (ALS)

Após o bombardeamento, o tecido é dividido entre dois frascos com meio fresco SB196 e cultivados como descrito acima. Seis a sete dias pós-bombardeamento, o SB196 é

trocado com SB196 fresco contendo agente de seleção de 100 ng/mL de clorsulfuron. O meio de seleção é atualizado semanalmente. Quatro a seis semanas após a seleção, tecido transformado, verde, pode ser observado crescendo a partir de clusters embriogênicos necróticos não transformados. Tecido verde, isolado, é removido e inoculado em placas multiposcos contendo SB196 para gerar novas culturas em suspensão embriogênicas transformadas, clonalmente propagadas.

10

Regeneração de embriões somáticos de soja em plantas

A fim de obter plantas inteiras a partir de culturas embriogênicas em suspensão, o tecido deve ser regenerado.

15 *Maturação do Embrião*

Os embriões são cultivados por 4-6 semanas a 26 ° C em SB196 sob iluminação fluorescente branca fria (branca fria Phillips Econowatt F40/CW/RS/EW) e lâmpadas Agro (Phillips F40 Agro) (40 watts) em um fotoperíodo de 16:8 hr com intensidade de luz de 90-120 uE/m²s. Após este tempo clusters de embriões são removidos de um meio de agar sólido, SB166, por 1-2 semanas. Clusters são então repicados para meio SB103 por três semanas. Durante este período, embriões individuais podem ser retirados dos clusters e selecionados para o marcador adequado ou para a capacidade da planta, quando injetados com os elementos de silenciamento, para controlar a Lepidoptera.

Dessecação e Germinação do embrião

Embriões individuais maduros são dessecados, colocando-os em uma placa de Petri vazio, pequena (35 x 10 mm) por cerca de 4-7 dias. As placas são vedadas com fita de fibra (criando uma pequena câmara de umidade). Embriões dessecados são plantados em meio SB71-4, onde foram

deixados para germinar sob as mesmas condições de cultura descritas acima. Plântulas germinadas são removidas do meio de germinação e lavadas cuidadosamente com água e em seguida plantadas em Redi-Terra em uma bandeja de 24 células, coberta com cúpula de plástico transparente. Após 2 semanas, a cúpula é removida e as plantas endurecidas por fora por uma semana adicional. Se as plântulas são observadas endurecidas elas são transplantadas para pote de Redi-terra de 10" com até três plântulas por vaso.

10

Receitas de Meios

SB 196 – Meio de proliferação líquido FN Lite (por litro) -

MS FeEDTA - 100x Estoque 1 10 mL

MS Sulfato - 100x Estoque 2 10 mL

15 FN Lite Halides - 100x Estoque 3 10 mL

FN Lite P,B,Mo - 100x Estoque 4 10 mL

vitaminas B5 (1mL/L) 1.0 mL

2,4-D (10mg/L de concentração final) 1.0 mL

KNO₃ 2.83 gm20 (NH₄)₂ SO₄ 0.463 gm

Asparagina 1.0 gm

Sacarose (1%) 10 gm

pH 5.8

25 FN Lite Soluções Estoque

Estoque #1000mL500mL

1 MS Fe EDTA 100x Estoque

Na₂ EDTA* 3.724 g 1.862 gFeSO₄ - 7H₂O 2.784 g 1.392 g

30 * Adicionado primeiro, dissolvido em um frasco escuro enquanto é agitado

2 MS Sulfato 100x Estoque

MgSO₄ - 7H₂O 37.0 g 18.5 gMnSO₄ - H₂O 1.69 g 0.845 g35 ZnSO₄ - 7H₂O 0.86 g 0.43 gCuSO₄ - 5H₂O 0.0025 g 0.00125 g

3	FN Lite Halides 100x Estoque		
	CaCl ₂ - 2H ₂ O	30.0 g	15.0 g
	KI	0.083 g	0.0715 g
	CoCl ₂ - 6H ₂ O	0.0025 g	0.00125 g

5	4	FN Lite P,B,Mo 100x Estoque		
		KH ₂ PO ₄	18.5 g	9.25 g
		H ₃ BO ₃	0.62 g	0.31 g
		Na ₂ MoO ₄ - 2H ₂ O	0.025 g	0.0125 g

10 Meio sólido SB1 (por litro) compreende: 1 pkg. de sais MS (Gibco/ BRL - Cat# 11117-066); 1 mL de vitaminas B5 1000X estoque; 31.5 g de sacarose; 2 mL de 2,4-D (20mg/ L de concentração final); pH 5.7; e, 8 g de agar TC.

15 Meio sólido SB 166 (por litro) compreende: 1 pkg. de sais MS (Gibco/ BRL - Cat# 11117-066); 1 mL de vitaminas B5 1000X estoque; 60 g de maltose; 750 mg de MgCl₂ hexahidrato; 5 g de carvão vegetal ativado; pH 5.7; e, 2 g de gelrite.

20 Meio sólido SB 103 (por litro) compreende: 1 pkg. de sais MS (Gibco/BRL - Cat# 11117-066); 1 mL de vitaminas B5 1000X estoque; 60 g de maltose; 750 mg de MgCl₂ hexahidrato; pH 5.7; e, 2 g de gelrite.

25 Meio sólido SB 71-4 (por litro) compreende: 1 garrafa de sais B5 de Gamborg w/ sacarose (Gibco/BRL - Cat# 21153-036); pH 5.7; e, 5 g de agar TC.

Estoque 2,4-D é obtido de Phytotech cat# D 295 - concentração é 1 mg/mL.

30 Estoque de Vitaminas B5 (por 100 mL) que é armazenado em alíquotas de -20C compreende: 10 g de mio-inositol; 100 mg de ácido nicotínico; 100 mg de piridoxina HCl; e, 1 g de tiamina. Se a solução não dissolve o suficiente rapidamente, é aplicado um baixo nível de calor através da placa quente. Estoque de Clorsulfuron compreende 1mg/mL em 0.01 N de Hidróxido de amônio.

Os artigos "a" e "um" são aqui utilizados para se referir a um ou mais de um (ou seja, pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um ou mais elementos.

5 Todas as publicações e pedidos de patentes mencionados na especificação são indicativos do nível daqueles versados na técnica a que se dirige esta invenção. Todas as publicações e pedidos de patente são aqui incorporados por referência, na mesma medida, como se cada publicação
10 individual ou pedido de patente fosse especificamente e individualmente, indicado para ser incorporado por referência.

 Embora a invenção anterior tenha sido descrita com algum pormenor a título de ilustração e exemplo para fins
15 de clareza de entendimento, será evidente que algumas alterações e modificações podem ser praticadas no âmbito das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para obtenção de uma célula vegetal caracterizado por compreender:

- a) transformar uma célula vegetal com um polinucleotídeo heterólogo compreendendo um elemento de silenciamento, onde o dito elemento de silenciamento compreende um fragmento de pelo menos 20 nucleotídeos consecutivos da SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50, sendo que o dito elemento de silenciamento, quando ingerido por uma praga da ordem Lepidoptera, reduz o nível de uma sequência alvo na referida praga e, assim, controla a praga da ordem Lepidoptera; e
- b) cultivar a referida célula vegetal sob condições de crescimento de célula vegetal.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita praga compreende *Spodoptera frugiperda*.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito elemento de silenciamento compreende

- a) um polinucleotídeo compreendendo a sequência senso ou antisenso da sequência estabelecida na SEQ ID NO: 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 108, 111, 114, 117, 120, 123, 126, 129, 132, 135, 138, 141, 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 198, 201, 204, 207, 210, 213, 216, 219, 222, 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, 249, 252, 255, 258, 261, 264, 267, 270, 273, 276, 279, 282, 285, 288, 291,

294, 297, 300, 303, 306, 309, 312, 315, 318, 321, 324,
 327, 330, 333, 336, 339, 342, 345, 348, 351, 354, 357,
 360, 363, 366, 369, 372, 375, 378, 381, 384, 387, 390,
 393, 396, 399, 402, 405, 408, 411, 415 ou 418;

5 b) um polinucleotídeo compreendendo a sequência senso ou
 antisenso de uma sequência tendo, pelo menos, 95% de
 identidade de sequência com a sequência estabelecida na
 SEQ ID NO: 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81,
 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 108, 111, 114, 117,
 10 120, 123, 126, 129, 132, 135, 138, 141, 144, 147, 150,
 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183,
 186, 189, 192, 195, 198, 201, 204, 207, 210, 213, 216,
 219, 222, 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, 249,
 252, 255, 258, 261, 264, 267, 270, 273, 276, 279, 282,
 15 285, 288, 291, 294, 297, 300, 303, 306, 309, 312, 315,
 318, 321, 324, 327, 330, 333, 336, 339, 342, 345, 348,
 351, 354, 357, 360, 363, 366, 369, 372, 375, 378, 381,
 384, 387, 390, 393, 396, 399, 402, 405, 408, 411, 415
 ou 418;

20 c) um polinucleotídeo compreendendo a sequência
 estabelecida na SEQ ID NO: 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61,
 62, 64, 65, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 76, 77, 79, 80, 82,
 83, 85, 86, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 97, 98, 100, 101,
 103, 104, 106, 107, 109, 110, 112, 113, 115, 116, 118,
 25 119, 121, 122, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 133, 134,
 136, 137, 139, 140, 142, 143, 145, 146, 148, 149, 151,
 152, 154, 155, 157, 158, 160, 161, 163, 164, 166, 167,
 169, 170, 172, 173, 175, 176, 178, 179, 181, 182, 184,
 185, 187, 188, 190, 191, 193, 194, 196, 197, 199, 200,
 30 202, 203, 205, 206, 208, 209, 211, 212, 214, 215, 217,
 218, 220, 221, 223, 224, 226, 227, 229, 230, 232, 233,
 235, 236, 238, 239, 241, 242, 244, 245, 247, 248, 250,
 251, 253, 254, 256, 257, 259, 260, 262, 263, 265, 266,

268, 269, 271, 272, 274, 275, 277, 278, 280, 281, 283,
 284, 286, 287, 289, 290, 292, 293, 295, 296, 298, 299,
 301, 302, 304, 305, 307, 308, 310, 311, 313, 314, 316,
 317, 319, 320, 322, 323, 325, 326, 328, 329, 331, 332,
 5 334, 335, 337, 338, 340, 341, 343, 344, 346, 347, 349,
 350, 352, 353, 355, 356, 358, 359, 361, 362, 364, 365,
 367, 368, 370, 371, 373, 374, 376, 377, 379, 380, 382,
 383, 385, 386, 388, 389, 391, 392, 394, 395, 397, 398,
 400, 401, 403, 404, 406, 407, 409, 410, 412, 413, 416,
 10 417, 419, ou 420;

d) um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de
 nucleotídeos tendo, pelo menos, 95% de identidade de
 sequência na SEQ ID NO: 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61, 62,
 64, 65, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 76, 77, 79, 80, 82, 83,
 15 85, 86, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 97, 98, 100, 101, 103,
 104, 106, 107, 109, 110, 112, 113, 115, 116, 118, 119,
 121, 122, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 133, 134, 136,
 137, 139, 140, 142, 143, 145, 146, 148, 149, 151, 152,
 154, 155, 157, 158, 160, 161, 163, 164, 166, 167, 169,
 20 170, 172, 173, 175, 176, 178, 179, 181, 182, 184, 185,
 187, 188, 190, 191, 193, 194, 196, 197, 199, 200, 202,
 203, 205, 206, 208, 209, 211, 212, 214, 215, 217, 218,
 220, 221, 223, 224, 226, 227, 229, 230, 232, 233, 235,
 236, 238, 239, 241, 242, 244, 245, 247, 248, 250, 251,
 25 253, 254, 256, 257, 259, 260, 262, 263, 265, 266, 268,
 269, 271, 272, 274, 275, 277, 278, 280, 281, 283, 284,
 286, 287, 289, 290, 292, 293, 295, 296, 298, 299, 301,
 302, 304, 305, 307, 308, 310, 311, 313, 314, 316, 317,
 319, 320, 322, 323, 325, 326, 328, 329, 331, 332, 334,
 30 335, 337, 338, 340, 341, 343, 344, 346, 347, 349, 350,
 352, 353, 355, 356, 358, 359, 361, 362, 364, 365, 367,
 368, 370, 371, 373, 374, 376, 377, 379, 380, 382, 383,
 385, 386, 388, 389, 391, 392, 394, 395, 397, 398, 400,

401, 403, 404, 406, 407, 409, 410, 412, 413, 416, 417, 419, ou 420. —

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que o dito elemento de silenciamento inclui um grampo de RNA.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreendendo o elemento de silenciamento compreende, na ordem a seguir, um primeiro segmento, um segundo segmento, e um terceiro segmento, onde

a) o dito primeiro segmento compreende pelo menos cerca de 20 nucleotídeos tendo pelo menos 90% de complementaridade de sequência a uma sequência alvo estabelecida na SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50;

b) o dito segundo segmento compreende uma alça de comprimento suficiente para permitir que o elemento de silenciamento seja transcrito como um RNA grampo; e

c) o dito terceiro segmento compreende pelo menos cerca de 20 nucleotídeos tendo pelo menos 85% de complementaridade com o primeiro segmento.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o dito elemento de silenciamento é operacionalmente ligado a um promotor heterólogo.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de a referida célula vegetal ter

estavelmente incorporada em seu genoma um segundo polinucleotídeo que compreende um elemento potenciador de supressão compreendendo a sequência-alvo da praga, ou uma variante ativa ou fragmento da mesma, onde a expressão combinada do elemento de silenciamento e o elemento potenciador de supressão aumenta a concentração de um RNAi inibidor específico para a sequência alvo de pragas na dita célula vegetal.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de a referida célula vegetal ser de uma monocotiledônea.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a dita monocotiledônea é milho, cevada, painço, trigo ou arroz.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de a referida célula vegetal ser de uma dicotiledônea.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a dita dicotiledônea é soja, canola, alfafa, girassol, cártamo, tabaco, *Arabidopsis* ou algodão.

25

12. Método para obtenção de planta ou parte de planta caracterizado por compreender o método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11 e compreender, adicionalmente:

c) regenerar uma planta ou parte de planta.

30

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a expressão combinada do dito elemento de silenciamento e o elemento potenciador supressor aumenta a

concentração de um RNA inibidor específico para a sequência alvo de pragas no floema da referida planta ou parte da planta.

5 14. Método para controlar Lepidoptera caracterizado por compreender alimentar uma Lepidoptera com uma composição que compreende um elemento de silenciamento, onde o dito elemento de silenciamento, quando ingerido pela dita Lepidoptera, reduz o nível da sequência alvo da Lepidoptera e, assim, controla a
10 Lepidoptera e o dito elemento de silenciamento compreende um fragmento de pelo menos 20 nucleotídeos consecutivos da SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47,
15 48, 49 ou 50.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a dita composição compreende planta ou parte da planta tendo incorporado estavelmente em seu genoma um
20 polinucleotídeo compreendendo o dito elemento de silenciamento.

17. Método de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que a dita praga compreende
25 *Spodoptera frugiperda*.

18. Método de acordo com as reivindicações 14, 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que o dito elemento de silenciamento inclui

30 a) um polinucleotídeo compreendendo a sequência senso ou antisenso da sequência estabelecida em SEQ ID NO: 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 108, 111, 114, 117, 120, 123, 126,

- 129, 132, 135, 138, 141, 144, 147, 150, 153, 156, 159,
162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192,
195, 198, 201, 204, 207, 210, 213, 216, 219, 222, 225,
228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, 249, 252, 255, 258,
5 261, 264, 267, 270, 273, 276, 279, 282, 285, 288, 291,
294, 297, 300, 303, 306, 309, 312, 315, 318, 321, 324,
327, 330, 333, 336, 339, 342, 345, 348, 351, 354, 357,
360, 363, 366, 369, 372, 375, 378, 381, 384, 387, 390,
393, 396, 399, 402, 405, 408, 411, 415 ou 418;
- 10 b) um polinucleotídeo compreendendo a sequência senso ou
antisense de uma sequência tendo, pelo menos, 95% de
identidade de sequência com a sequência estabelecida na
SEQ ID NO: 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81,
84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 108, 111, 114, 117,
15 120, 123, 126, 129, 132, 135, 138, 141, 144, 147, 150,
153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183,
186, 189, 192, 195, 198, 201, 204, 207, 210, 213, 216,
219, 222, 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, 249,
252, 255, 258, 261, 264, 267, 270, 273, 276, 279, 282,
20 285, 288, 291, 294, 297, 300, 303, 306, 309, 312, 315,
318, 321, 324, 327, 330, 333, 336, 339, 342, 345, 348,
351, 354, 357, 360, 363, 366, 369, 372, 375, 378, 381,
384, 387, 390, 393, 396, 399, 402, 405, 408, 411, 415
ou 418;
- 25 c) um polinucleotídeo compreendendo a sequência
estabelecida na SEQ ID NO: 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61,
62, 64, 65, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 76, 77, 79, 80, 82,
83, 85, 86, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 97, 98, 100, 101,
103, 104, 106, 107, 109, 110, 112, 113, 115, 116, 118,
30 119, 121, 122, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 133, 134,
136, 137, 139, 140, 142, 143, 145, 146, 148, 149, 151,
152, 154, 155, 157, 158, 160, 161, 163, 164, 166, 167,
169, 170, 172, 173, 175, 176, 178, 179, 181, 182, 184,

185, 187, 188, 190, 191, 193, 194, 196, 197, 199, 200,
 202, 203, 205, 206, 208, 209, 211, 212, 214, 215, 217,
 218, 220, 221, 223, 224, 226, 227, 229, 230, 232, 233,
 235, 236, 238, 239, 241, 242, 244, 245, 247, 248, 250,
 5 251, 253, 254, 256, 257, 259, 260, 262, 263, 265, 266,
 268, 269, 271, 272, 274, 275, 277, 278, 280, 281, 283,
 284, 286, 287, 289, 290, 292, 293, 295, 296, 298, 299,
 301, 302, 304, 305, 307, 308, 310, 311, 313, 314, 316,
 317, 319, 320, 322, 323, 325, 326, 328, 329, 331, 332,
 10 334, 335, 337, 338, 340, 341, 343, 344, 346, 347, 349,
 350, 352, 353, 355, 356, 358, 359, 361, 362, 364, 365,
 367, 368, 370, 371, 373, 374, 376, 377, 379, 380, 382,
 383, 385, 386, 388, 389, 391, 392, 394, 395, 397, 398,
 400, 401, 403, 404, 406, 407, 409, 410, 412, 413, 416,
 15 417, 419, ou 420;

d) um polinucleotídeo compreendendo a sequência
 estabelecida na SEQ ID NO: 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61,
 62, 64, 65, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 76, 77, 79, 80, 82,
 83, 85, 86, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 97, 98, 100, 101,
 20 103, 104, 106, 107, 109, 110, 112, 113, 115, 116, 118,
 119, 121, 122, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 133, 134,
 136, 137, 139, 140, 142, 143, 145, 146, 148, 149, 151,
 152, 154, 155, 157, 158, 160, 161, 163, 164, 166, 167,
 169, 170, 172, 173, 175, 176, 178, 179, 181, 182, 184,
 25 185, 187, 188, 190, 191, 193, 194, 196, 197, 199, 200,
 202, 203, 205, 206, 208, 209, 211, 212, 214, 215, 217,
 218, 220, 221, 223, 224, 226, 227, 229, 230, 232, 233,
 235, 236, 238, 239, 241, 242, 244, 245, 247, 248, 250,
 251, 253, 254, 256, 257, 259, 260, 262, 263, 265, 266,
 30 268, 269, 271, 272, 274, 275, 277, 278, 280, 281, 283,
 284, 286, 287, 289, 290, 292, 293, 295, 296, 298, 299,
 301, 302, 304, 305, 307, 308, 310, 311, 313, 314, 316,
 317, 319, 320, 322, 323, 325, 326, 328, 329, 331, 332,

334, 335, 337, 338, 340, 341, 343, 344, 346, 347, 349,
350, 352, 353, 355, 356, 358, 359, 361, 362, 364, 365,
367, 368, 370, 371, 373, 374, 376, 377, 379, 380, 382,
383, 385, 386, 388, 389, 391, 392, 394, 395, 397, 398,
5 400, 401, 403, 404, 406, 407, 409, 410, 412, 413, 416,
417, 419, ou 420.

18. Método de acordo com as reivindicações 14, 15, 16 ou 17,
caracterizado pelo fato de que o dito elemento de
10 silenciamento inclui um RNA grampo.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado
pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreendendo o
elemento de silenciamento compreende, na ordem a seguir, um
15 primeiro segmento, um segundo segmento, e um terceiro
segmento, onde

- a) o dito primeiro segmento compreende pelo menos cerca de
20 nucleotídeos tendo, pelo menos, 90% de
complementaridade de sequência com o polinucleotídeo
20 alvo;
- b) o dito segundo segmento compreende uma alça de
comprimento suficiente para permitir que o elemento de
silenciamento seja transcrito como um RNA grampo; e
- c) o dito terceiro segmento compreende pelo menos cerca de
25 20 nucleotídeos tendo, pelo menos, 85% de
complementaridade com o primeiro segmento.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a
19, caracterizado pelo fato de que o dito elemento de
30 silenciamento é operacionalmente ligado a um promotor
heterólogo.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 20, caracterizado pelo fato de que a dita planta ou parte da planta tem estavelmente incorporado no seu genoma um segundo polinucleotídeo compreendendo um elemento potenciador de
5 supressão compreendendo a sequência-alvo da praga, ou uma variante ativa ou fragmento da mesma, onde a expressão combinada do elemento de silenciamento e o elemento potenciador supressor aumenta a concentração de um RNAi inibidor específico para a sequência alvo da praga na dita
10 célula vegetal.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 21, caracterizado pelo fato de que a dita planta é uma monocotiledônea.

15 23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a dita monocotiledônea é milho, cevada, painço, trigo ou arroz.

20 24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 21, caracterizado pelo fato de que a dita planta é uma dicotiledônea.

25 25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a dita planta é soja, canola, alfafa, girassol, cártamo, tabaco, *Arabidopsis*, ou algodão.

RESUMO**MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE UMA CÉLULA VEGETAL, PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA OU PARTE DE PLANTA E PARA CONTROLAR LEPIDOPTERA**

São fornecidos métodos e composições os quais empregam um elemento de silenciamento que, quando ingerido por uma praga, como uma praga da ordem Lepidoptera, são capazes de diminuir a expressão de uma sequência alvo na praga. Em concretizações específicas, a diminuição na expressão da sequência alvo controla a praga e, assim, os métodos e composições são capazes de limitar os danos a uma planta. A presente invenção proporciona polinucleotídeos alvo codificando polipeptídeos de famílias de proteínas específicas e vários polinucleotídeos alvo estabelecidos nas SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 ou variantes e fragmentos das mesmas, onde uma diminuição na expressão de uma ou mais sequências na praga-alvo controla a praga (ou seja, tem atividade inseticida). Ainda são fornecidos elementos de silenciamento que, quando ingeridos pela praga diminuem o nível do polipeptídeo alvo e, assim, controlam a praga. Na concretização específica, a praga é *Spodoptera frugiperda*. Também são fornecidas plantas, parte das plantas, bactérias e outras células hospedeiras compreendendo os elementos de silenciamento ou uma variante ativa ou fragmento do mesmo, da invenção.

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

Código de Controle

Campo 1



4ACF0C78FDBD5EB4

Campo 2



F03D5A36AA5EA802

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P1791 Listagem de Sequências.txt
- Data de Geração do Código: 10-11-2011
- Hora de Geração do Código: 17:12:08
- Código de Controle:
 - Campo 1: 4ACF0C78FDBD5EB4
 - Campo 2: F03D5A36AA5EA802