



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

(21) BR 102013032649-6 A2

(22) Data do Depósito: 18/12/2013

(43) Data da Publicação: 10/02/2016

(RPI 2353)



* B R 1 0 2 0 1 3 0 3 2 6 4 9 A

(54) Título: MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE DE INSETOS - PRAGA EM PLANTAS POR MEIO DO SILENCIAMENTO DE GENES DA FAMÍLIA DA QUITINA SINTASE E DA VITELOGENINA BEM COMO ALTERNATIVAMENTE PELA EXPRESSÃO DO GENE DE UMA TOXINA CRY

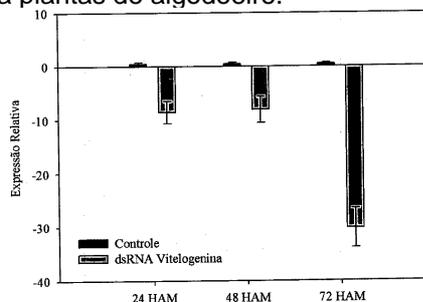
(51) Int. Cl.: C12N 15/62; C12N 15/52; C12N 15/32; A01H 5/00; C12R 1/07

(73) Titular(es): EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

(72) Inventor(es): MARIA FÁTIMA GROSSI DE SÁ, ROBERTA RAMOS COELHO, ALEXANDRE AUGUSTO PEREIRA FIMINO, LEONARDO LIMA PEPINO DE MACEDO, MARIA CRISTINA MATTAR DA SILVA, ISABELA TRISTAN LOURENÇO

(74) Procurador(es): SIBELE DE ANDRADE SILVA

(57) Resumo: MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE DE INSETOS-PRAGA EM PLANTAS POR MEIO DO SILENCIAMENTO DE GENES DA FAMÍLIA DA QUITINA SINTASE E DA VITELOGENINA BEM COMO ALTERNATIVAMENTE PELA EXPRESSÃO DO GENE DE UMA TOXINA CRY. A presente invenção está relacionada ao controle de infestação de praga através da inibição ou redução da expressão de genes da família da quitina sintase e da vitelogenina bem como através da expressão da toxina Cry8ka5. A invenção prove ainda métodos e composições para o controle de pragas, através da alimentação de uma ou mais moléculas de RNA de fita dupla provida pela presente invenção bem como através da ação da toxina Cry8ka5 sobre os insetos-alvo. A invenção descreve ainda um método de obtenção de plantas transgênicas que expressem moléculas de PINA de fita dupla e a proteína tóxica Cry8ka5. A presente invenção é preferencialmente utilizada para plantas de algodoeiro.



“MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE DE INSETOS-PRAGA EM PLANTAS POR MEIO DO SILENCIAMENTO DE GENES DA FAMÍLIA DA QUITINA SINTASE E DA VITELOGENINA BEM COMO ALTERNATIVAMENTE PELA EXPRESSÃO DO GENE DE UMA TOXINA CRY”.

CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção refere-se ao campo de controle de insetos-praga que atacam lavouras agrícolas, especialmente algodoeiros, por meio da utilização de construções gênicas específicas contendo dsRNA de Quitina Sintase 2 do bicudo do algodoeiro, dsRNA de Vitelogenina de bicudo do algodoeiro e alternativamente toxina Cry8ka5, expressas em plantas de algodão.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[2] A agricultura é, nos dias de hoje, uma das bases mais importantes da economia de países em desenvolvimento. No Brasil, as principais culturas que sustentam a economia são: algodão, soja, milho, café, cana-de-açúcar, entre outras (DANTAS, R.J.E.S.; LIMA, M.F.S.; WOSCH, L.F.O. et al. Conhecendo o Brasil em números. In: DEPLA, editor. Brasília. pp. 16. 2010). Estas culturas são de grande importância sócio-econômica, contribuindo relevantemente no PIB brasileiro, além da geração direta e indireta de empregos, seja na cadeia de produção ou em produtos derivados (AVELAR, S.O.C.; VILELA, P.S. Evolução do número de pessoas ocupadas na agropecuária brasileira no período de 1990 a 2004. Revista Política Agrícola: 4-8. 2006).

[3] No entanto, a maioria destas culturas, como o algodão, é cultivada em grandes áreas em sistema de monocultura, o que favorece a incidência de pragas, sendo que as perdas causadas por insetos atingem aproximadamente 60% da produção (Abrapa. Relatório do Biênio 2008/ 2010. In: Abrapa, editor. 2010). A forma de controle de pragas mais utilizada na cultura do algodão é o controle químico, o que aumenta substancialmente os custos de produção, além de provocar danos à natureza e à saúde dos trabalhadores do campo. Diante disto, vários estudos têm sido realizados visando o desenvolvimento de estratégias de

controle mais eficientes (DIAS, S.C.; da SILVA, M.C.M.; TEIXEIRA, F.R. et al., Investigation of insecticidal activity of rye alpha-amylase inhibitor gene expressed in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) toward cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 98: 39-44. 2010). Com o advento do Manejo Integrado de Pragas (MIP), várias estratégias têm sido estudadas e utilizadas em harmonia com sucesso, modificando, aos poucos, a visão dos agricultores com relação ao uso indiscriminado de inseticidas. Dentro deste contexto, a utilização de ferramentas biotecnológicas e a transformação de plantas surgiram como uma estratégia promissora para a obtenção de cultivares, mais produtivas e resistentes, além de serem menos prejudiciais ao meio ambiente e reduzirem custos de produção (GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA-NETO S. et al., Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ. 649 p. 2002).

[4] A prospecção de novos genes e proteínas, juntamente com a produção de plantas transgênicas é uma estratégia promissora para o controle de insetos-praga em diversas etapas do seu ciclo de vida. Por exemplo, plantas modificadas geneticamente contendo genes de resistência, toxinas protéicas como as Cry de *Bacillus thuringiensis* (MAHON, R.J.; OLSEN, K.M. Limited survival of a Cry2Ab- resistant strain of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bollgard II. Journal of Economic Entomology, 102: 708-716. 2009) ou contendo RNA interferente (BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W. et al., Control of coleopteran insect pests through RNA interference. Nature Biotechnology, 25: 1322-1326. 2007) poderão ser usados como novas ferramentas de controle de pragas.

[5] A utilização cada vez maior de plantas transgênicas resistentes a insetos tem mostrado diversos benefícios econômicos, ambientais e para a saúde humana (CHRISTOU, P.; CAPELL, T.; KOHLI, A. et al., Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. Trends in Plant Science, 11: 302-308. 2006). As principais variedades transgênicas com efeitos entomotóxicos bem estabelecidos em algodoeiro expressam toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Mas, atualmente especial foco tem sido dado à utilização do mecanismo de RNA interferente tanto para a elucidação de funções gênicas como para controle de pragas via silenciamento gênico (BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W. et al., Control of coleopteran insect pests through RNA interference. Nature Biotechnology, 25: 1322-1326. 2007).

[6] O mecanismo de RNA interferente (RNAi) é um processo que ocorre naturalmente nas células e em diversos organismos eucarióticos. Este foi descrito primeiramente em plantas, denominado como silenciamento gênico pós-transcricional, ou PTGS (JORGENSEN, R.A.; CLUSTER, P.D.; ENGLISH, J., et al., Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Molecular Biology*, 31: 957-973. 1996). No entanto, a primeira descrição de silenciamento gênico em animais, assim como sua melhor compreensão, foi obtida em *Caenorhabditis elegans*, nematóide de vida livre e organismo modelo nestes estudos (FIRE, A. RNA-triggered gene silencing. *Trends in Genetics*, 15: 358-363. 1999). Em plantas, acreditava-se inicialmente que o mecanismo de RNAi era utilizado como defesa contra efeitos da movimentação de transposons, ou ainda, contra infecção por vírus (VOINNET, O. RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 444-451. 2002). Entretanto, atualmente sabe-se que esse processo participa de forma integral na regulação da expressão gênica em várias plantas e outros eucariotos (LILLEY, C.J.; BAKHETIA, M.; CHARLTON, W.L. et al., Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. *Molecular Plant Pathology*, 8. 2007).

[7] Neste contexto, o RNAi vem se mostrando uma ferramenta promissora no auxílio ao controle de pragas. Seu mecanismo de ação baseia-se principalmente na introdução de um RNA dupla fita (dsRNA) em um organismo alvo, geralmente por meio de ingestão (FIRE, A. RNA-triggered gene silencing. *Trends in Genetics*, 15: 358-363. 1999). Esse RNA dupla fita inicia um processo de silenciamento gênico pós-transcricional, por meio da degradação de mRNAs homólogos, causando uma diminuição na síntese da proteína correspondente (MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431: 343-349. 2004), dificultando a sobrevivência ou até mesmo levando o organismo a morte.

[8] Esta técnica já vem sendo utilizada com sucesso para a obtenção de plantas resistentes a pragas, como no caso de *Nicotiana tabacum* (YADAV, B.C.; VELUTHAMBI, K.; SUBRAMANIAM, K. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. *Molecular and Biochemical*

Parasitology, 148: 219-222. 2006), *Arabidopsis thaliana* (HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, E.L. et al., Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 103: 14302-14306. 2006) e *Glycine max* (IBRAHIM, H.M.; ALKHAROUF, N.W., MEYER, S.L. et al., Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots. Experimental Parasitology, 127: 90-99. 2011), apresentando resistência acima de 90% ao fitoparasita *Meloidogyne incognita*.

[9] Desde a sua descrição inicial, a técnica transformou-se em uma ferramenta valiosa para a genômica funcional de insetos, em particular com *Drosophila melanogaster* (XIE, X.; DUBROVSKAYA, V.A.; DUBROVSKY, E.B. RNAi knockdown of dRNaseZ, the *Drosophila* homolog of ELAC2, impairs growth of mitotic and endoreplicating tissues. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 41: 167-177. 2011; KENNERDELL, J.R.; CARTHEW, R.W. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. Nature Biotechnology, 18: 896-898. 2000). A metodologia mais utilizada na maior parte dos estudos com insetos é a microinjeção de dsRNA na hemolinfa do inseto, que para fins práticos é inviável, pois não corresponde ao que ocorre na natureza. No entanto, diversos estudos também têm sido feitos visando a incorporação do dsRNA na dieta artificial ou água do inseto para avaliar os efeitos do silenciamento através da ingestão da dupla-fita de RNA (ZHANG, J.Z.; LIU, X.J.; ZHANG, J.Q. et al., Silencing of two alternative splicing-derived mRNA variants of chitin synthase 1 gene by RNAi is lethal to the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 40: 824-833. 2010; ZHU, F.; XU, J.J., PALLI, R. et al., Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. Pest Management Science, 67: 175-182. 2011).

[10] Um dos principais alvos das pesquisas associadas ao controle de insetos pragas é a perspectiva de entender e interferir nos processos vitais do inseto, dentro desta perspectiva, a reprodução é o processo pelo qual as populações tendem a crescer e se estabelecer no sistema agrícola. Neste contexto, é importante a realização de pesquisas que visem

interferir na bioquímica e fisiologia da reprodução, para o controle de insetos praga, por meio da interrupção do crescimento populacional.

[11] A vitelogenina é uma glicoproteína específica de fêmeas, precursora do vitelo e produzida por todos os animais ovíparos. É geralmente sintetizada em grandes quantidades diretamente antes da deposição do vitelo e é de fundamental importância na reprodução (BYRNE, B.M.; GRUBER, M.; AB, G. The evolution of egg yolk proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 53: 33-69. 1989).

[12] Nos insetos, a maior fonte de nutrientes para os oócitos é a vitelogenina, usualmente produzida fora do ovário, nos corpos gordurosos, secretada na hemolinfa, e reconhecida especificamente por oócitos em desenvolvimento e depositada no citoplasma em sua forma de estoque, o vitelo (KLOWDEN, M.J. *Physiological Systems in Insects*. Moscow: Elsevier. 688 p. 2007).

[13] Um uso alternativo da vitelogenina é relatado em abelhas operárias que não produzem ovos, mesmo sendo fêmeas. A vitelogenina que elas produzem se liga as suas glândulas hipofaríngeas, e produzem a geléia real utilizada para alimentar a futura abelha rainha. Usada como uma versátil proteína de estoque que pode ser adotada em diversos processos metabólicos, a vitelogenina pode suplementar o metabolismo de operárias e a síntese da geléia real quando as fontes de pólen são escassas. Outros insetos podem produzir ovos tróficos fortificados com vitelogenina e os ovipositam apenas para serem consumidos pela prole (KLOWDEN, M.J. *Physiological Systems in Insects*. Moscow: Elsevier. 688 p. 2007).

[14] Tendo em vista que o bicudo-do-algodoeiro apresenta apenas uma cópia do gene que codifica esta proteína (TREWITT, P.M.; HEILMANN, L.J.; DEGRUGILLIER, S.S. et al., The boll weevil vitellogenin gene: nucleotide sequence, structure, and evolutionary relationship to nematode and vertebrate vitellogenin genes. *Journal of Molecular Evolution*, 34: 478-492. 1992), ela se torna um alvo promissor para o silenciamento gênico visando o controle deste inseto, visto que não é possível haver um efeito de compensação, o que poderia ocorrer se houvesse outra cópia deste gene.

[15] Um outro gene alvo importante para ser utilizado na estratégia da RNAi, especialmente para combater insetos-praga é o gene da quitina. A quitina, um

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

[16] A membrana peritrófica é uma estrutura funcional que recobre o intestino médio dos insetos. As principais funções atribuídas a esta membrana são a de proteção mecânica contra injúria as células do intestino médio (WIGGLESWORTH, V., *The principles of insect physiology*. 7 ed.; Chapman and Hall: London, Vol. p 827. 1972), uma barreira física contra microorganismos (PETERS, W., *Peritrophic membranes*. Springer-Verlag New York, Vol. 1992), uma barreira seletiva para enzimas digestivas e produtos de digestão (DAY, M. F.; WATERHOUSE, D. F., *Functions of the alimentary system*. John Wiley: New York, Vol. p 299-310. 1953) e atuação no mecanismo de reciclagem de enzimas digestivas, fenômeno conhecido como circulação ectoendoperitrófica (TERRA, W. R., *Physiology and Biochemistry of Insect Digestion - an Evolutionary Perspective*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 21, n. 4. p. 675-734. 1988; TERRA, W. R.; FERREIRA, C., *Insect Digestive Enzymes - Properties, Compartmentalization and Function*. Comparative Biochemistry and Physiology BBiochemistry & Molecular Biology, v. 109, n. 1. p. 1-62. 1994; TERRA, W. R., *The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 47, n. 2. p. 47-61, 2001).

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

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

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

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

[21] É estratégico para a pesquisa em tecnologias que visem oferecer produtos para o controle de insetos-praga, o fluxo contínuo de obtenção de novas moléculas inseticidas, para aplicar em diferentes estratégias moleculares com objetivo de obter plantas geneticamente modificadas e resistentes ao inseto-alvo. Estas ações ajudam na obtenção de eventos elite para auxiliar no controle de maneira sustentável, uma vez que os insetos são capazes de evoluir e adaptar-se rapidamente às novas condições, conseguindo inativar mecanismos de defesas naturais ou “artificialmente” inseridos nas plantas. Atualmente, há

uma grande utilização de genes que codificam toxinas entomotóxicas Cry, de *Bacillus thuringiensis* (Bt), em plantas geneticamente modificadas comercializadas para o controle de inseto-praga. Entretanto, já existem alguns relatos de quebra de resistência, por insetos que se alimentam destas plantas. Neste contexto, a presente invenção tem a característica de apresentar métodos de composição de construções gênicas, utilizando estratégia que combina a expressão conjunta de atividade de toxicidade ao inseto-alvo e silenciamento de genes essenciais para o desenvolvimento do bicudo do algodoeiro, já que esta estratégia dificulta o desenvolvimento de resistência múltipla do inseto, visto que os mecanismos de ação das moléculas utilizadas são muito distintos.

[22] Dessa forma, a presente invenção utiliza tanto uma construção gênica contendo os dois dsRNA (Vitelogenina e Quitina Sintase 2) quanto uma construção gênica específica contendo toxina Cry8ka5, dsRNA de Quitina Sintase 2 do bicudo do algodoeiro e dsRNA de Vitelogenina de bicudo do algodoeiro para expressão em plantas de algodão. Essas estratégias são úteis para interrupção do ciclo de vida do bicudo-do-algodoeiro e tenta driblar a quebra de resistência. Além disto, considerando a eficaz capacidade de adaptação dos insetos às moléculas inseticidas, o conhecimento validado na presente invenção representa ativos para a agricultura brasileira, os quais poderão ser aplicados, separadamente ou em conjunto, (em estratégia de pirimidização) na obtenção de resistência sustentável das plantas GM.

SUMÁRIO DA INVENCÃO

[23] A presente invenção está relacionada a um método para obtenção de plantas de algodão resistentes ou mais tolerantes a insetos-praga. Especificamente a presente invenção está relacionada a obtenção de plantas de algodão resistentes ou mais tolerantes ao bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*).

[24] Em uma concretização a invenção descreve uma construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;

- (iii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iv) uma seqüência separadora;
- (v) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
- (vi) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
- (vii) um terminador funcional em planta; e alternativamente
- (viii) um promotor funcional em planta;
- (ix) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5;
- (x) um terminador funcional em planta.

[25] Em outra concretização a invenção descreve uma construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
- (viii) um terminador funcional em planta.

[26] Em ainda outra concretização a invenção descreve uma construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
- (v) um terminador funcional em planta;

- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
- (viii) um terminador funcional em planta.

[27] A invenção descreve ainda um método para produzir plantas transgênicas capazes de produzir dsRNA de interesse a fim de que o inseto-praga, ao nutrir-se destas plantas, tenham gene alvo silenciado, caracterizado por compreender os estágios de:

- I) prover uma construção gênica caracterizada por compreender:
 - (i) um promotor funcional em planta;
 - (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
 - (iii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
 - (iv) uma seqüência separadora;
 - (v) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
 - (vi) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
 - (vii) um terminador funcional em planta; e alternativamente
 - (viii) um promotor funcional em planta;
 - (ix) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5;
 - (x) um terminador funcional em planta.

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

- III) crescer ou regenerar planta transgênica da célula ou células transgênicas.

[28] A invenção descreve também um método para produzir plantas transgênicas capazes de produzir dsRNA de interesse a fim de que o inseto-praga, ao nutrir-se destas plantas, tenham gene alvo silenciado, caracterizado por compreender os estágios de:

- I) prover uma construção gênica caracterizada por compreender:
 - (i) um promotor funcional em planta;
 - (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;

- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
- (viii) um terminador funcional em planta.

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

III) crescer ou regenerar planta transgênica da célula ou células transgênicas.

A invenção descreve também um método para produzir plantas transgênicas capazes de produzir dsRNA de interesse a fim de que o inseto-praga, ao nutrir-se destas plantas, tenham gene alvo silenciado, caracterizado por compreender os estágios de:

I) prover uma construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
- (viii) um terminador funcional em planta.

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

III) crescer ou regenerar planta transgênica da célula ou células transgênicas.

[29] Outra concretização da invenção é um método para controle de insetos-praga caracterizado por compreender a disponibilização em sua dieta de um agente

compreendendo uma seqüência de ribonucleotídeo de filamento duplo, produzida a partir da construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
- (iii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iv) uma seqüência separadora;
- (v) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
- (vi) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
- (vii) um terminador funcional em planta; e alternativamente
- (viii) um promotor funcional em planta;
- (ix) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5;
- (x) um terminador funcional em planta.

[30] A invenção provê também um método para controle de insetos-praga caracterizado por compreender a disponibilização em sua dieta de um agente compreendendo uma seqüência de ribonucleotídeo de filamento duplo produzida a partir da construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
- (viii) um terminador funcional em planta.

[31] A invenção provê também um método para controle de insetos-praga caracterizado por compreender a disponibilização em sua dieta de um agente compreendendo uma seqüência de ribonucleotídeo de filamento duplo, produzida a partir da construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
- (viii) um terminador funcional em planta.

[32] Outra concretização da invenção é um método para melhorar o rendimento de plantas cultivadas, sujeitas à infestação por insetos-praga, caracterizado por compreender as etapas de:

- I. Obtenção de planta transgência a partir da introdução de uma construção gênica compreendendo:
 - (i) um promotor funcional em planta;
 - (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
 - (iii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
 - (iv) uma seqüência separadora;
 - (v) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
 - (vi) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
 - (vii) um terminador funcional em planta; e alternativamente
 - (viii) um promotor funcional em planta;

(ix) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5;

(x) um terminador funcional em planta.

II. Cultivo da planta obtida em "I" de modo que esta expresse as seqüências de interesse da referida construção gênica, a fim de que os produtos desta expressão reduzam ou suprimam a população dos insetos-praga.

[33] Ainda outra concretização da invenção é um método para melhorar o rendimento de plantas cultivadas, sujeitas à infestação por insetos-praga, caracterizado por compreender as etapas de:

I. Obtenção de planta transgência a partir da introdução de uma construção gênica compreendendo:

(i) um promotor funcional em planta;

(ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;

(iii) uma seqüência separadora;

(iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;

(v) um terminador funcional em planta;

(vi) um promotor funcional em planta;

(vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e

(viii) um terminador funcional em planta

II. Cultivo da planta obtida em "I" de modo que esta expresse as seqüências de interesse da referida construção gênica, a fim de que os produtos desta expressão reduzam ou suprimam a população dos insetos-praga.

[34] Ainda outra concretização da invenção é um método para melhorar o rendimento de plantas cultivadas, sujeitas à infestação por insetos-praga, caracterizado por compreender as etapas de:

I. Obtenção de planta transgência a partir da introdução de uma construção gênica compreendendo:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
- (viii) um terminador funcional em planta.

II. Cultivo da planta obtida em "I" de modo que esta expresse as seqüências de interesse da referida construção gênica, a fim de que os produtos desta expressão reduzam ou suprimam a população dos insetos-praga.

[35] A invenção descreve ainda um método de produção de um produto caracterizado pelo fato de compreender a obtenção de uma planta contendo a construção gênica da presente invenção, ou parte da mesma, e o seu preparo a partir do todo ou parte desta planta, a fim de que este seja disponibilizado na dieta de insetos de interesse, visando a redução ou supressão de sua população.

[36] A invenção prevê ainda iniciadores de ácido nucleico compreendendo uma primeira e segunda molécula de ácido nucleico capaz de amplificar uma construção gênica da presente invenção.

[37] É ainda um aspecto da presente invenção um kit para identificar uma molécula de ácido nucleico de uma amostra biológica caracterizado por compreender um primeiro e segundo iniciador de ácido nucleico onde estes são capazes de amplificar uma molécula substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas.

[38] Outro objeto da presente invenção diz respeito a um método de identificar uma planta contendo a construção gênica da presente invenção caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a. Formar uma mistura compreendendo uma amostra biológica contendo DNA de planta e um primeiro e segundo iniciador de ácido nucleico capaz de amplificar uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas;

b. Reagir a mistura sob condições que permitam ao primeiro e segundo iniciadores amplificar uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas; e

c. Detectar a presença de um fragmento amplificado de uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas, onde a presença da molécula de ácido nucleico específica na planta indica que esta é um evento de planta geneticamente modificada.

[39] É ainda objeto da presente invenção um método de identificar uma planta contendo quaisquer das construções gênicas da presente invenção caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a. Formar uma mistura compreendendo uma amostra biológica contendo um DNA de planta e uma sonda de molécula de ácido nucleico capaz de hibridizar a uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No. 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID No 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas;

b. Reagir a mistura sob condições que permitam à sonda da molécula de ácido nucleico hibridizar a uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID No 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas; e

c. Detectar a hibridização da sonda ao DNA, onde a presença de hibridização da sonda da molécula de ácido nucleico ao DNA de planta indica que esta é um evento de planta geneticamente modificada.

[40] Outro objeto da presente invenção diz respeito a um método de reprodução de uma planta resistente a insetos-praga caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a. Cruzar uma planta compreendendo uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas com uma segunda planta;
- b. Obter semente do cruzamento do passo (a);
- c. Obter uma amostra de DNA do embrião da semente; e
- d. Detectar a presença de uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas, onde a presença desta indica que a semente é capaz de produzir uma planta resistente a inseto-praga.

[41] A invenção também descreve um método para cultivar planta caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a. Prover semente ou muda compreendendo uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas;

- b. Plantar ou semear o material obtido na etapa (a) em substrato, solo ou ambiente propício à germinação ou brotação, crescimento e desenvolvimento adequados visando a produção vegetal, consubstanciando-se, o conjunto, em sistema de cultivo onde são controladas populações de insetos-praga.

[42] São também aspectos da invenção, vetores de transformação e expressão, células e plantas transgênicas, métodos para a expressão das moléculas da presente invenção nessas plantas, bem como o uso destas moléculas no controle de insetos-praga.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[43] **Figura 1.** Análise da expressão relativa de transcritos de Vitelogenina 24, 48 e 72 horas após microinjeção (HAM) de moléculas de dsRNA utilizando como genes de referência, GAPDH e beta-actina. Tratamento controle consistiu de cDNA sintetizado a partir do RNA extraído de fêmeas microinjetadas com H₂O depada. No tratamento da microinjeção de dsRNA da Vitelogenina, foram microinjetados 500 ng de dsRNA.

[44] **Figura 2.** Média do número total de ovos depositados pelas fêmeas de *A. grandis* provenientes dos tratamentos de microinjeção com H₂O depada, dsRNA de GUS e dsRNA de Vitelogenina ao longo de 15 dias de duração do bioensaio.

[45] **Figura 3.** Média do número total de larvas eclodidas a partir dos ovos depositados pelas fêmeas de *A. grandis* provenientes dos tratamentos de microinjeção com H₂O depada, dsRNA de GUS e dsRNA de Vitelogenina ao longo de 15 dias de duração do bioensaio.

[46] **Figura 4.** Larvas/ ovos de *A. grandis* 96 horas após a oviposição realizada por fêmeas microinjetadas com H₂O depada, dsRNA de GUS e dsRNA de Vitelogenina. Sendo (A). Larva recém eclodida, 96 horas após a oviposição realizada por fêmea microinjetada do tratamento controle mostrando desenvolvimento típico para este tempo, característico dos ovos provenientes dos tratamentos controle; e (B). Ovo com desenvolvimento abortado após 96 horas de oviposição, demonstrando parada do desenvolvimento do embrião.

[47] **Figura 5.** Esquema representativo do cassete de expressão da construção gênica pBSK-AdsVitCHS-Cry8 utilizada para transformar plantas de algodão visando o silenciamento de genes alvo e super expressão de toxinas Cry. A construção possui o promotor, gene e terminador Ahas, promotor UCEA 1.7, dsRNA de quitina sintase 2 do bicudo do algodoeiro, dsRNA de vitelogenina do bicudo do algodoeiro, o promotor GHPGFS1 de expressão em botão floral, isolado de *Arabidopsis*, o gene para toxina Cry8ka5 e o terminador de Nopalina Sintase (tNOS).

[48] **Figura 6.** Análise do produto da PCR utilizando DNA genômico de plantas de algodão geneticamente transformadas com a construção pBSK-AdsVitCHS-Cry8. Os Números indicam várias plantas T0, CP (controle positivo, DNA plasmidial); CN (controle negativo, somente a mistura da reação, sem a adição do DNA). A seta indica amplicon de 300 bp representando a amplificação com oligos para o dsRNA (CHS2 e Vit).

[49] **Figura 7.** Esquema representativo do cassete de expressão da construção gênica pBSK-AdsVitCHS utilizada para transformar plantas de algodão visando o silenciamento de genes alvo. A construção possui o promotor, gene e terminador Ahas, promotor UCEA 1.7, dsRNA de quitina sintase 2 do bicudo do algodoeiro, dsRNA de vitelogenina do bicudo do algodoeiro e o terminador de Nopalina Sintase (tNOS).

[50] Figura 8. Esquema representativo do cassete de expressão da construção gênica pBSK-AdsCHS-Cry8 utilizada para transformar plantas de algodão visando o silenciamento do gene alvo e super expressão de toxinas Cry. A construção possui o promotor, gene e terminador Ahas, promotor UCEA 1.7, dsRNA de quitina sintase 2 do bicudo do algodoeiro, o promotor GHPGFS1 de expressão em botão floral, isolado de Arabidopsis, o gene para toxina Cry8ka5 e o terminador de Nopalina Sintase (tNOS).

[51] **Figura 9.** Esquema representativo do cassete de expressão da construção gênica pBSK-AdsVit-Cry8 utilizada para transformar plantas de algodão visando o silenciamento de genes alvo e super expressão de toxinas Cry. A construção possui o promotor, gene e terminador Ahas, promotor UCEA 1.7, dsRNA de vitelogenina do bicudo do algodoeiro, o promotor GHPGFS1 de expressão em botão floral, isolado de Arabidopsis, o gene para toxina Cry8ka5 e o terminador de Nopalina Sintase (tNOS).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS DO ANEXO I

[52] **FIGURA 1A.** Representação em cores da Figura 4 visando a melhor compreensão de alguns dos aspectos da invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

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

[54] A presente invenção proporciona um método de inibição da expressão de genes alvo em coleópteros. Em certas formas de realização, o método compreende a modulação ou

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

[55] Além da inibição da expressão de dois genes alvo em coleótero, a presente invenção proporciona ainda a obtenção de plantas de algodão resistentes ou mais tolerantes a insetos-praga devido à possibilidade de expressão da toxina Cry8ka5 (SEQ ID No 5 - Cry8ka5 e SEQ ID No 6 - Cry8ka5_aa). A presente invenção compreende ainda fragmentos e variantes das sequências descritas na presente invenção relacionadas à toxina Cry8ka5 (SEQ ID No 5 - Cry8ka5 e SEQ ID No 6 - Cry8ka5_aa). As proteínas entomotóxicas descritas são biologicamente ativas contra alguns insetos-praga pertencentes à ordem Coleoptera, como por exemplo: o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis*; o verme da raiz do milho ocidental, *Diabrotica virgifera virgifera*; a vaquinha, *Diabrotica longicornis barberi*; o besouro do pepino, *Diabrotica undecimpunctata howardi*. Pragas adicionais incluem: larvas de besouros elatérios como *Melanotus*, *Eleodes*, *Conoderus*, e *Aeolus* spp; besouro japonês, *Popillia japonica*; larva branca, *Phyllophaga crinita*; pulguinha do milho e do arroz, *Chaetocnema pulicaria*; besouro do caule de girassol, *Cylindrocapturus adspersus*; besouro de semente de girassol cinza, *Smicronyx sordidus*; besouro de girassol, *Zygogramma exclamationis*; besouro de alfafa, *Hypera nigrirostris*; besouro 'sem asa' de

crucíferas, *Phyllotreta cruciferae*; besouro da batata Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*; besouro ‘sem asa’ listrado, *Phyllotreta striolata*; besouro ‘sem asa’ listrado da raiz de mostarda, *Phyllotreta nemorum* e o besouro de Brassica, *Meligethes aeneus*.

[56] A presente invenção proporciona ainda exemplos de composições de ácido nucleico que são homólogas a pelo menos uma porção das sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmentos ou complementos destas.

[57] Em ainda outro aspecto, a invenção proporciona um método para a supressão da expressão do gene de uma praga coleópteros, tais como bicudo-do-algodoeiro ou de espécies relacionadas, que compreende o passo de proporcionar na dieta da praga de uma quantidade gene supressor de pelo menos um dsRNA molécula transcrita a partir de uma sequência nucleotídica tal como aqui descrito, pelo menos, um segmento do qual é complementar a uma sequência miRNA dentro das células da praga. O método pode ainda compreender a morte, nanismo, ou cessação da alimentação da praga. Uma molécula de dsRNA, incluindo a sua forma modificada tal como uma molécula de siRNA, alimentada a uma praga de acordo com o invento pode ser de pelo menos de cerca de 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou cerca de 100% de identidade com uma molécula de RNA transcrita a partir das sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4 ou fragmentos ou complementos destas.

[58] Além disso, a invenção fornece ainda um fragmento ou concatêmero de uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir das sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4 ou fragmentos ou complementos destas. O fragmento pode ser definido como causando morte, ou prejudicando o desenvolvimento de um organismo nocivo quando expresso como um dsRNA e fornecido para a praga. O fragmento pode, por exemplo, compreender pelo menos cerca de 19, 21, 23, 25, 40, 60, 80, 100, 125 ou mais nucleotídeos contíguos das sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, ou fragmentos ou complementos destas, ou um seu complemento. Um segmento de

DNA benéfico para uso no presente invento é pelo menos 19 a cerca de 23, ou cerca de 23 até cerca de 100 nucleotídeos até cerca de 2000 nucleótidos de comprimento ou mais. Particularmente útil para a presente invenção são sequências de DNA, incluindo cerca de 19 a cerca de 400 nucleotídeos homólogos a uma sequência alvo de pragas. A invenção proporciona também um ácido ribonucleico expresso a partir de qualquer de tais sequências, incluindo um dsRNA. A sequência selecionada para utilização na expressão de um agente de supressão de gene pode ser construída a partir de uma única sequência derivada de uma ou mais pragas alvo e destinada a ser utilizada na expressão de um RNA que funciona na supressão de um único gene ou família de genes em uma ou mais pragas alvo, ou a sequência de DNA pode ser construída como uma quimera de uma pluralidade de sequências de DNA. Especificamente para a presente invenção essa família de genes está relacionada à família dos genes da quitina sintase, especificamente à quitina sintase 2, e à família dos genes da vitelogenina.

[59] Em ainda outro aspecto, o invento proporciona construções de DNA recombinante que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica uma molécula de dsRNA aqui descrita. O dsRNA pode ser formado por uma fita de transcrição da molécula de uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos de cerca de 80% a cerca de 100% idêntica às sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, ou fragmentos ou complementos destas. Tais construções de DNA recombinante podem ser definidas como a produção de moléculas de dsRNA, capazes de inibir ou reduzir a expressão do gene alvo endógeno (s) numa célula praga após a ingestão. A construção pode incluir uma sequência nucleotídica do invento operativamente ligado a uma sequência de promotor que funciona na célula hospedeira. A presente invenção pode se utilizar de promotores tecido-específicos ou constitutivos. Preferencialmente para a presente invenção os promotores tecido-específicos podem ser, mas não estão limitados a, promotores específicos para botões florais de plantas de algodão. Preferencialmente a presente invenção utiliza o promotor uceA 1.7 (SEQ ID No 9) para expressão do dsRNAs e o promotor GHPGFS1 (SEQ ID No 10) para expressão da proteína Cry8ka5.

[60] Construções de ácido nucleico de acordo com a invenção podem compreender pelo menos uma sequência de nucleótidos que não ocorre naturalmente e que pode ser transcrita

em um RNA de cadeia simples, capazes de formar uma molécula de dsRNA in vivo por meio de hibridização. Tais sequências de dsRNA podem ser fornecidas na dieta de uma praga de coleópteros para alcançar a inibição desejada.

[61] Uma construção de DNA recombinante pode conter sequências substancialmente similares às sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmentos ou complementos destas. Os dsRNAs podem expressar a partir de construções introduzidas em vários eventos de transformação diferentes, ou podem ser introduzidos numa única molécula de ácido nucleico. Os dsRNAs podem ser expressos utilizando um único promotor ou promotores múltiplos. Em um aspecto, a invenção proporciona uma célula hospedeira recombinante ter no seu genoma pelo menos uma sequência de DNA recombinante que é transcrito para produzir pelo menos uma molécula de dsRNA, que funciona quando ingeridos por uma praga de coleópteros para inibir ou reduzir a expressão de um gene alvo em uma praga. A molécula de dsRNA pode ser codificada pelas sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4 ou fragmentos ou complementos destas. A presente invenção também proporciona uma célula vegetal transformada tendo no seu genoma pelo menos uma sequência de DNA recombinante aqui descrita. As plantas transgênicas que compreendem tal célula de planta transformada são também fornecidas, incluindo as plantas de progênie de qualquer geração, as sementes, e produtos vegetais, cada uma compreendendo o DNA recombinante. Preferencialmente as construções da presente invenção são substancialmente similares à SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 19 e SEQ ID No 20.

[62] Os métodos e composições da presente invenção podem ser aplicados a qualquer planta monocotiledônea e dicotiledônea, dependendo do controle de pragas de coleópteros desejado. Assim, a presente invenção descreve uma planta transformada com uma sequência de DNA recombinante, como descrito as sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 19 e SEQ ID No 20 ou fragmentos, ou concatâmeros ou complementos destas, que é transcrito para produzir pelo menos uma

molécula de dsRNA, que funciona quando ingerido por uma praga de coleópteros para inibir ou reduzir a expressão de um gene alvo.

[63] A invenção proporciona também combinações de métodos e composições para controlar infestações de pragas de coleópteros. Um meio de fornecer um método dsRNA como aqui descrito para a protecção de plantas contra a infestação de insetos é em conjunto com um ou mais agentes insecticidas que exibem características diferentes das exibidas pelos métodos e composições de dsRNA. Por exemplo, uma ou mais proteínas de Bt pode ser disponibilizada na dieta das pragas de insetos, em combinação com um ou mais dsRNAs tal como aqui descrito. A composição formulada para aplicação tópica ou derivada utilizando uma abordagem transgênica, que combina os métodos e as composições de dsRNA com Bt pode ser utilizada para criar sinergias que não eram conhecidos anteriormente na arte para controlar a infestação de insetos. Uma sinergia é a redução no nível de expressão necessária para o dsRNA (s) ou a proteína de Bt (s). Quando combinadas, a menor dose eficaz de cada um dos agentes de controle de pragas pode ser usada. Acredita-se que as proteínas de Bt insecticidas crie poros de entrada através dos quais as moléculas de dsRNA são capazes de penetrar de forma mais eficaz em espaços remotos a partir do intestino da praga de insetos, ou de forma mais eficiente para as células na proximidade das lesões criadas pela proteína Bt, requerendo assim menos quantidade de Bt ou dsRNA para atingir o resultado desejado de ação insecticida ou a inibição desejada ou supressão de uma função biológica específica na praga alvo.

[64] A presente invenção proporciona portanto uma composição que contenha um ou mais diferentes agentes pesticidas tóxicos para a mesma praga ou espécie de insetos onde, pelo menos, um dos quais compreende um dsRNA aqui descritos. Em certas concretizações, o segundo agente pode ser um agente selecionado a partir do grupo que consiste de uma patatina, uma proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*, uma proteína Xenorhabdus insecticida, uma proteína Photorhabdus insecticida, uma proteína de *Bacillus laterosporous* insecticida, uma proteína de *Bacillus sphaericus* insecticida, enzimas da família de quitinase e uma lignina. Uma proteína de *Bacillus thuringiensis* insecticida pode ser qualquer uma de uma série de proteínas insecticidas, incluindo, mas não limitado a CryI, Cry8, Cry10, Cry35 TIC851, CryET70, Cry225 TIC901, TIC1201, TIC407, TIC417,

proteína inseticida CryET33 e binário CryET34, proteína binária inseticida CryET80 e CryET76, proteína inseticida binária TIC100 e TIC101, binário inseticida da proteína PS 149Bl, proteína VIP inseticida, proteína TIC900 ou afins, ou combinações das proteínas inseticidas ET29 ou ET37 com proteínas inseticidas TIC810 ou TIC812 e quimeras inseticidas de qualquer uma das proteínas anteriores. Particularmente para a presente invenção é utilizada a toxina Cry8ka5 (SEQ ID No 5 - Cry8ka5 e SEQ ID No 6 - Cry8ka5_aa).

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

[66] Um gene alvo pode codificar para a supressão de uma proteína essencial. Para a presente invenção os genes alvo são da família da quitina sintase, cuja função é a constituição da formação da cutícula, traquéia e quitina da membrana peritrófica, e os genes da família da vitelogenina, que é de fundamental importância na reprodução dos insetos. Portanto, a inibição ou redução da expressão de tais genes poderá afetar funções essenciais para sobrevivência do inseto a ser selecionada do grupo de diferenciação e desenvolvimento da cutícula, formação do ovo, maturação larval, transição de estágio larval, pupação, digestão e assimilação de nutrientes, proteção contra patógenos.

[67] A invenção proporciona ainda, em conjunto com a supressão de genes essenciais aos insetos, a expressão de uma toxina Cry para melhorar a resposta de ação das plantas contra os insetos-praga. Particularmente para a presente invenção, é utilizada uma proteína descrita e isolada no pedido de patente PI0906128-2, a toxina Cry8ka5 (SEQ ID No 5 - Cry8ka5 e SEQ ID No 6 - Cry8ka5_aa).

[68] Dessa forma, a invenção provê uma construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
- (iii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iv) uma seqüência separadora;
- (v) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
- (vi) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
- (vii) um terminador funcional em planta; e alternativamente
- (viii) um promotor funcional em planta;
- (ix) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5;
- (x) um terminador funcional em planta.

[69] A invenção descreve ainda uma construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
- (viii) um terminador funcional em planta.

[70] Em ainda outra concretização a invenção descreve uma construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;

- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
- (viii) um terminador funcional em planta.

[71] A invenção descreve ainda um método para produzir plantas transgênicas capazes de produzir dsRNA de interesse a fim de que o inseto-praga, ao nutrir-se destas plantas, tenham gene alvo silenciado, caracterizado por compreender os estágios de:

- I) prover uma construção gênica caracterizada por compreender:
 - (i) um promotor funcional em planta;
 - (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
 - (iii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
 - (iv) uma seqüência separadora;
 - (v) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
 - (vi) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
 - (vii) um terminador funcional em planta; e alternativamente
 - (viii) um promotor funcional em planta;
 - (ix) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5;
 - (x) um terminador funcional em planta.

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

- III) crescer ou regenerar planta transgênica da célula ou células transgênicas.

[72] A invenção descreve também um método para produzir plantas transgênicas capazes de produzir dsRNA de interesse a fim de que o inseto-praga, ao nutrir-se destas plantas, tenham gene alvo silenciado, caracterizado por compreender os estágios de:

- I) prover uma construção gênica caracterizada por compreender:
 - (i) um promotor funcional em planta;

- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
- (viii) um terminador funcional em planta.

II) inserir a molécula obtida em “I” em célula ou células de planta para produzir uma célula ou células transgênicas; e

III) crescer ou regenerar planta transgênica da célula ou células transgênicas.

A invenção descreve também um método para produzir plantas transgênicas capazes de produzir dsRNA de interesse a fim de que o inseto-praga, ao nutrir-se destas plantas, tenham gene alvo silenciado, caracterizado por compreender os estágios de:

I) prover uma construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
- (viii) um terminador funcional em planta.

II) inserir a molécula obtida em “I” em célula ou células de planta para produzir uma célula ou células transgênicas; e

III) crescer ou regenerar planta transgênica da célula ou células transgênicas.

[73] Outra concretização da invenção é um método para controle de insetos-praga caracterizado por compreender a disponibilização em sua dieta de um agente compreendendo uma seqüência de ribonucleotídeo de filamento duplo produzida a partir da construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
- (iii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iv) uma seqüência separadora;
- (v) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
- (vi) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
- (vii) um terminador funcional em planta; e alternativamente
- (viii) um promotor funcional em planta;
- (ix) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5;
- (x) um terminador funcional em planta.

[74] A invenção provê também um método para controle de insetos-praga caracterizado por compreender a disponibilização em sua dieta de um agente compreendendo uma seqüência de ribonucleotídeo de filamento duplo produzida a partir da construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e

(viii) um terminador funcional em planta.

[75] A invenção provê também um método para controle de insetos-praga caracterizado por compreender a disponibilização em sua dieta de um agente compreendendo uma seqüência de ribonucleotídeo de filamento duplo produzida a partir da construção gênica caracterizada por compreender:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
- (viii) um terminador funcional em planta.

[76] Outra concretização da invenção é um método para melhorar o rendimento de plantas cultivadas, sujeitas à infestação por insetos-praga, caracterizado por compreender as etapas de:

II. Obtenção de planta transgência a partir da introdução de uma construção gênica compreendendo:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
- (iii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iv) uma seqüência separadora;
- (v) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
- (vi) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
- (vii) um terminador funcional em planta; e alternativamente

- (viii) um promotor funcional em planta;
- (ix) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5;
- (x) um terminador funcional em planta.

II. Cultivo da planta obtida em “I” de modo que esta expresse as sequências de interesse da referida construção gênica, a fim de que os produtos desta expressão reduzam ou suprimam a população dos insetos-praga.

[77] Ainda outra concretização da invenção é um método para melhorar o rendimento de plantas cultivadas, sujeitas à infestação por insetos-praga, caracterizado por compreender as etapas de:

II. Obtenção de planta transgênia a partir da introdução de uma construção gênica compreendendo:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5;
- e
- (viii) um terminador funcional em planta

II. Cultivo da planta obtida em “I” de modo que esta expresse as sequências de interesse da referida construção gênica, a fim de que os produtos desta expressão reduzam ou suprimam a população dos insetos-praga.

[78] Ainda outra concretização da invenção é um método para melhorar o rendimento de plantas cultivadas, sujeitas à infestação por insetos-praga, caracterizado por compreender as etapas de:

I. Obtenção de planta transgênia a partir da introdução de uma construção gênica compreendendo:

- (i) um promotor funcional em planta;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iii) uma seqüência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
- (v) um terminador funcional em planta;
- (vi) um promotor funcional em planta;
- (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
- (viii) um terminador funcional em planta.

II. Cultivo da planta obtida em "I" de modo que esta expresse as sequências de interesse da referida construção gênica, a fim de que os produtos desta expressão reduzam ou suprimam a população dos insetos-praga.

[79] A invenção descreve ainda um método de produção de um produto caracterizado pelo fato de compreender a obtenção de uma planta contendo a construção gênica da presente invenção, ou parte da mesma, e o seu preparo a partir do todo ou parte desta planta, a fim de que este seja disponibilizado na dieta de insetos de interesse, visando a redução ou supressão de sua população.

[80] A invenção prevê ainda iniciadores de ácido nucleico compreendendo uma primeira e segunda molécula de ácido nucleico capaz de amplificar uma construção gênica da presente invenção.

[81] É ainda um aspecto da presente invenção um kit para identificar uma molécula de ácido nucleico de uma amostra biológica caracterizado por compreender um primeiro e segundo iniciador de ácido nucleico onde estes são capazes de amplificar uma molécula substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas.

[82] Outro objeto da presente invenção diz respeito a um método de identificar uma planta contendo a construção gênica da presente invenção caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a. Formar uma mistura compreendendo uma amostra biológica contendo DNA de planta e um primeiro e segundo iniciador de ácido nucleico capaz de amplificar uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas;

b. Reagir a mistura sob condições que permitam ao primeiro e segundo iniciadores amplificar uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas; e

c. Detectar a presença de um fragmento amplificado de uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas, onde a presença da molécula de ácido nucleico específica na planta indica que esta é um evento de planta geneticamente modificada.

[83] É ainda objeto da presente invenção um método de identificar uma planta contendo quaisquer das construções gênicas da presente invenção caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a. Formar uma mistura compreendendo uma amostra biológica contendo um DNA de planta e uma sonda de molécula de ácido nucleico capaz de hibridizar a uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou fragmento das mesmas;

b. Reagir a mistura sob condições que permitam à sonda da molécula de ácido nucleico hibridizar a uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou fragmento das mesmas; e

c. Detectar a hibridização da sonda ao DNA, onde a presença de hibridização da sonda da molécula de ácido nucleico ao DNA de planta indica que esta é um evento de planta geneticamente modificada.

[84] Outro objeto da presente invenção diz respeito a um método de reprodução de uma planta resistente a insetos-praga caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a. Cruzar uma planta compreendendo uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas com uma segunda planta;

b. Obter semente do cruzamento do passo (a);

c. Obter uma amostra de DNA da semente; e

d. Detectar a presença de uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou fragmento das mesmas, onde a presença desta indica que a semente é capaz de produzir uma planta resistente a inseto-praga.

[85] A invenção também descreve um método para cultivar planta caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a. Prover semente ou muda compreendendo uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas;

b. Plantar ou semear o material obtido na etapa (a) em substrato, solo ou ambiente propício à germinação ou brotação, crescimento e desenvolvimento adequados visando a produção vegetal, consubstanciando-se, o conjunto, em sistema de cultivo onde são controladas populações de insetos-praga.

[86] São também aspectos da invenção, vetores de transformação e expressão, células e plantas transgênicas, métodos para a expressão das moléculas da presente invenção nessas plantas, bem como o uso destas moléculas no controle de insetos-praga.

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

[88] O termo “ácido nucleico” refere-se a uma grande molécula a qual pode ser fita simples ou fita dupla, composta de monômeros (nucleotídeos) contendo um açúcar, um fosfato e uma base purina ou pirimidina. Um “fragmento de ácido nucleico” é uma fração de uma dada molécula de ácido nucleico. “Complementaridade” refere-se ao pareamento

específico de bases purinas e pirimidinas que consistem de ácidos nucleicos: pares de adenina com timina e pares de guanina com citosina. Então, o “complemento” de um primeiro fragmento de ácido nucleico refere-se ao segundo fragmento de ácido nucleico cuja sequência de nucleotídeos é complementar à primeira sequência de nucleotídeos.

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

[90] “Gene” refere-se ao fragmento de nucleotídeo que expressa uma proteína específica, incluindo sequências regulatórias precedentes (região 5’ não traduzida) e posteriores (região 3’ não traduzida) à região codificadora. “Gene nativo” refere-se a um gene isolado com sua própria sequência reguladora encontrada na natureza. “Gene quimérico” refere-se ao gene que compreende sequências codificadoras, regulatórias e heterogêneas não encontradas na natureza. O gene quimérico da presente invenção compreende moléculas isoladas de ácido nucleicos, na orientação sense ou antisense, ligadas operacionalmente a promotores ativos. Construções gênicas da presente invenção podem conter 1 ou mais genes quiméricos e podem ou não apresentar íntrons. “Gene endógeno” refere-se ao gene nativo normalmente encontrado em sua localização natural no genoma e não é isolado. Um

“gene exógeno” refere-se a um gene que não é normalmente encontrado no organismo hospedeiro, mas que é introduzido por transferência gênica. “Pseudogene” refere-se a uma sequência nucleotídica que não codifica uma enzima funcional.

[91] “Sequência codificadora” refere-se à sequência de DNA que codifica uma proteína específica e exclui a sequência não codificadora. Uma “sequência codificadora interrompida” significa a sequência que atua como separadora (por exemplo, um ou mais íntrons ligados através de junções). Um “íntron” é uma sequência de nucleotídeo que é transcrita e está presente no pré mRNA, mas é removida através de clivagem e a re-ligação do mRNA dentro da célula gerando um mRNA maduro que pode ser traduzido em uma proteína. Exemplos de íntrons incluem, mas não são limitados a, íntron *pknox2*, íntron catalase da mamona, íntron Delta 12 desnaturase de algodão, Delta 12 desnaturase de *Arabidopsis*, íntron ubiquitina de milho, íntron de SV40, íntrons do gene da malato sintase.

[92] “Transcrito de RNA” refere-se ao produto resultante da transcrição catalisada pela RNA polimerase de uma sequência de DNA. Quando o transcrito de RNA é uma cópia perfeita da sequência de DNA, ele é referido como transcrito primário ou ele pode ser uma sequência de RNA derivada de um processo pós-transcricional do transcrito primário e é então referido como transcrito maduro. “RNA mensageiro (mRNA)” refere-se ao RNA que está sem íntrons. “RNA sense” refere-se a um transcrito de RNA que inclui o mRNA. “RNA antisense” refere-se a um transcrito de RNA que é complementar a todas as partes de um transcrito primário ou mRNA e que pode bloquear a expressão de um gene alvo através da interferência no processamento, transporte e/ou tradução do seu transcrito primário ou mRNA. A complementaridade de um RNA antisense pode ser com qualquer parte do transcrito gênico específico, isto é, sequência 5' não traduzida, sequência 3' não traduzida, íntrons ou sequência codificadora. Além disso, o RNA antisense pode conter regiões de sequências ribozima que aumentam a eficácia do RNA antisense para bloquear a expressão gênica. “Ribozima” refere-se ao RNA catalítico e inclui sequências específicas de endoribonucleases. “DsRNA (dupla-fita)” refere-se a estrutura em grampo formada entre a sequência do mRNA ou RNA sense, a sequência de uma região espaçadora e a sequência do RNA antisense. “Região espaçadora” refere-se à sequência de nucleotídeo que não está relacionada com a sequência do gene alvo, como a sequência de um íntron.

[93] O termo “vetor” diz respeito a um replicon, como plasmídeo, fago ou vírus, no qual outras sequências genéticas ou elementos (sejam eles de DNA ou RNA) podem ser ligados. Desta forma, os genes podem ser replicados juntamente com o vetor. O termo “vetor recombinante” é resultante da combinação de um vetor comercial com moléculas de ácido nucleico da presente invenção operacionalmente ligadas a um promotor de interesse e um sinal de terminação. Tais vetores podem ser obtidos comercialmente, incluindo aqueles fornecidos por Clontech Laboratories, Inc (Palo Alto, Calif.), Stratagene (La Jolla, Calif.), Invitrogen (Carlsbad, Calif.), New England Biolabs (Beverly, Mass.) e Promega (Madison, Wis.). Alguns exemplos de vetores utilizados na presente invenção, mas não limitados, são os vetores da série pCambia (BioForge Co.), pBI121 (Chen, Po-Yen; Wang, Chen-Kuen; Soong, Shaw-Ching; To, Kin-Ying. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular Breeding* vol. 11 issue 4 May 2003. p. 287-293), pBSK (Addgene Co.), pGEM-T easy (Promega Corporation), pET101/ D-TOPO (Invitrogen). A obtenção de vetores recombinantes compreendendo promotores ligados a ácidos nucleicos é conhecida no estado da técnica e pode ser encontrada em Sambrook et al. (Sambrook, J., Russell, D. W., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989).

[94] “Substancialmente similar” ou “similaridade substancial” refere-se a fragmentos de ácidos nucleicos nos quais mudanças em uma ou mais bases de nucleotídeos não afetam a habilidade do fragmento de ácido nucleico mediar a alteração da expressão gênica pelo silenciamento gênico, por exemplo, da tecnologia antisense, co-supressão ou RNA de interferência (RNAi). Fragmentos de ácido nucleico substancialmente similares da presente invenção podem ser caracterizados também pela porcentagem de similaridade de suas sequências de nucleotídeos com as sequências de nucleotídeo dos fragmentos de ácidos nucleicos descritas aqui (SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 19 e SEQ ID NO 20), como determinada por algoritmos comuns empregados no estado da técnica. Os fragmentos de ácidos nucleicos preferidos são aqueles cujas sequências de nucleotídeos têm pelo menos cerca de 40 ou 45% de identidade de sequência, preferencialmente cerca de 50% ou 55% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de 60% ou 65% de identidade de

sequência, mais preferencialmente cerca de 70% ou 75% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de 80% ou 85% de identidade de sequência, mais preferencialmente ainda com cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência quando comparada com a sequência de referência.

[95] Uma das formas de se formar o dsRNA é estando presente na molécula de DNA a sequência de nucleotídeos do gene alvo na orientação sense, e uma sequência de nucleotídeos na orientação antisense, podendo haver ou não uma região espaçadora entre as sequências de nucleotídeos sense e antisense. As sequências de nucleotídeos mencionadas podem ser constituídas de cerca de 19nt a 2000nt ou ainda cerca de 5000 nucleotídeos ou mais, cada um tendo uma similaridade substancial de sequência total com cerca de 40% a 100%. Quanto mais longa for a sequência, menos estringência é requerida para similaridade substancial total da sequência. Os fragmentos contendo pelo menos cerca de 19 nucleotídeos devem ter preferencialmente cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência quando comparada com a sequência de referência, com possibilidade de ter cerca de 2 nucleotídeos distintos não contíguos. Preferencialmente são utilizados fragmentos acima de 60pb, mais preferencialmente ainda fragmentos entre 100 a 600pb.

[96] Em um dos aspectos da invenção, a molécula de dsRNA pode compreender uma ou mais regiões tendo uma similaridade substancial de sequência para as regiões com pelo menos cerca de 19 nucleotídeos consecutivos dos nucleotídeos sense do gene alvo, definida como primeira região e, uma ou mais regiões tendo uma similaridade substancial de sequência para as regiões com cerca de 19 nucleotídeos consecutivos do complemento dos nucleotídeos sense do gene alvo, definida como segunda região, onde essas regiões podem ter pares de bases separando-as uma da outra.

[97] Convenientemente, o dsRNA (RNA de dupla fita) como descrito pode ser introduzido dentro de células hospedeiras pela introdução e possível integração de uma construção gênica contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção, transcrição das mesmas para produção do dsRNA.

[98] “Promotor” refere-se à sequência de DNA em um gene, usualmente localizada a montante da sequência codificadora, a qual controla a expressão da sequência codificadora

promovendo o reconhecimento pela RNA polimerase e outros fatores requeridos para a própria transcrição. Em uma construção de DNA artificial, promotores podem também ser utilizados para transcrever dsRNA. Promotores podem também conter sequências de DNA que estão envolvidas na ligação de fatores de proteínas as quais controlam o efeito do início da transcrição em resposta a condições fisiológicas ou de desenvolvimento.

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

[100] O promotor pode conter elementos “enhancers”. Um “enhancer” é uma sequência de DNA que pode estimular a atividade do promotor. Ela pode ser um elemento inato do promotor ou um elemento heterólogo inserido para aumentar o nível e/ou a tecido-especificidade de um promotor. “Promotores constitutivos” referem-se àqueles que dirigem a expressão gênica em todos os tecidos e durante todo tempo. Promotores “tecido-específicos” ou “desenvolvimento-específicos” são aqueles que dirigem a expressão gênica quase que exclusivamente em tecidos específicos, tais como folhas, raízes, caules, flores, frutos ou sementes, ou em estágios do desenvolvimento específicos em um tecido, como no início ou final da embriogênese. O termo “expressão” refere-se a transcrição e acumulação estável do dsRNA derivado dos fragmentos de ácidos nucleicos da invenção que, em conjunto com a aparelhagem de produção de proteína da célula, resulta em níveis alterados de mio-inositol 1-fosfato sintase. “Inibição por interferência” refere-se a produção de transcritos de dsRNA capazes de prevenir a expressão da proteína alvo.

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

[102] “Níveis alterados” referem-se à produção de produtos gênicos em organismos transgênicos em quantidades ou proporções que diferem daquelas em organismos normais

ou não-transgênicos. A presente invenção também relata vetores, os quais incluem sequências do gene da enzima quitina 2 e gene da vitelogenina na orientação sense e antisense, e células hospedeiras, as quais são geneticamente engenheiradas com vetores da invenção. “Transformação” refere-se a transferência do gene exógeno para dentro do genoma de um organismo hospedeiro e sua herança geneticamente estável.

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

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

específicos de mesófilo, promotores específicos de raiz (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller et al., 1989 Genes Devel. 3:1639-1646), promotores específicos de tubérculos (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keil et al., 1989 EMBO J. 8: 1323:1330), promotores específicos de tecidos vasculares (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Peleman et al., 1989 Gene 84: 359-369), promotores específicos de estames (WO8910396, WO9213956), promotores específicos da zona de deiscência (WO9713865); e semelhantes.

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

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

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

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

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

utilizando-se métodos balísticos, tais como bombardeamento de partículas recobertas com DNA.

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

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

[112] Células de plantas transformadas que são derivadas de qualquer uma das técnicas de transformação descritas acima pode ser cultivadas para regenerar uma planta inteira que possua o genótipo transformado e então o fenótipo desejado tal como ausência ou redução da formação de estruturas quitinosas de insetos coleópteros tais como a cutícula e/ou a membrana peritrófica. Tais técnicas de regeneração contam com a manipulação de certos fitohormônios em meio de crescimento de cultura de tecidos, tipicamente contendo um marcador biocida e/ou herbicida, que deve ser introduzido junto com a sequência de nucleotídeos desejada. Regeneração de plantas a partir de cultura de protoplastos é descrita em Evans et al., *Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture*, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; e Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985 (como mencionado no

pedido de patente US20020152501). A regeneração pode ser também obtida através de calos de planta, explantes, órgãos, ou parte da mesma. Tais técnicas de regeneração são descritas geralmente em Klee et al., Ann. Ver. Of Plant Phys. 38:467-486, 1987 1985 (como mencionado no pedido de patente US20020152501).

[113] Sem restringir a invenção para um particular modo de ação, espera-se que a enzima em células eucariotas responsável por gerar pequenas moléculas de RNA com cerca de 21 nucleotídeos de dsRNA (como a DICER em *Drosophila*) possa ser saturada através da inclusão de um excesso de sequências de dsRNA (isto é, moléculas de RNA complementares) que não estão relacionadas com a sequência de nucleotídeos do gene alvo ou do gene a ser silenciado.

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

[115] As concretizações da presente invenção podem ser efetivas contra uma variedade de pragas. Para os propósitos da presente invenção, as pragas incluem, mas não estão limitadas a, insetos, fungos, bactérias, nematóides, ácaros, patógenos protozoários, parasitas animais, e semelhantes. Pragas de particular interesse são insetos-praga, particularmente insetos-praga que causam danos significativos para plantas agrícolas. Entende-se como “insetos-praga” insetos e outras pragas similares tais como, por exemplo, os insetos das ordens Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc., particularmente Coleoptera, especialmente *Anthonomus grandis*, *Diabrotica virgifera*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum*, *Phoracantha semipunctata*, *Lixus angustatus*, *Acanthoscelides obtectus* e outros coleópteros que causam danos a madeiras e plantas agronomicamente importantes das famílias Scolytidae, Cerambycidae, Curculionidae e Bostrichida. Insetos-praga da presente invenção da maioria das cultivares incluem, mas não estão limitadas a: Milho - *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera*

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

varivestis, *Myzus persicae*, *Empoasca fabae*, *Acrosternum hilare*, *Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus differentialis*, *Hylemya platura*, *Sericothrips variabilis*, *Thrips tabaci*, *Tetranychus turkestanii*, *Tetranychus urticae*; Cevada - *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Schizaphis graminum*, *Blissus leucopterus leucopterus*; *Acrosternum hilare*, *Euschistus servus*, *Jylemya platura*, *Mayetiola destructor*, *Petrobia latens*; Canola - *Vrevicoryne brassicae*, *Phyllotreta cruciferae*, *Phyllotreta striolata*, *Phyllotreta nemorum*, *Meligethes aeneus*, *Meligethes rufimanus*, *Meligethes nigrescens*, *Meligethes canadianus*, e *Meligethes viridescens*; Batata - *Leptinotarsa decemlineata*. Particularmente para a presente invenção a praga de interesse é o *Anthonomus grandis*.

EXEMPLOS

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

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

[118] **Exemplo 1** – Identificação de seqüência de nucleotídeos da proteína Vitelogenina de *Anthonomus grandis* para preparo do dsRNA.

[119] Ovos, larvas e insetos adultos de *A. grandis* foram obtidos do Laboratório de bioecologia e semioquímicos de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília-DF. A colônia é alimentada com dieta artificial como descrito por Oliveira et al (2011) e mantida a 26 ± 2 °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. Para

a clonagem e sequenciamento de vitelogenina de *A. grandis*, o RNA total de foi isolado de insetos adultos utilizando Trizol (Invitrogen) seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 5µg de RNA total utilizando o kit Superscript II™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) utilizando oligo d(T)-AP. Para a amplificação inicial do fragmento gênico de vitelogenina de *A. grandis* foram utilizados iniciadores específicos, vit F (SEQ ID NO 12) -e VitR SEQ ID NO 13) tomando como referência a sequencia da vitelogenina depositada no banco de dados público NCBI (código de acesso: M72980.1). Foi realizada uma etapa de PCR utilizando os iniciadores específicos para a clonagem do fragmento gênico. As reações de PCR foram realizadas utilizando as seguintes condições: 94°C por 1 min, temperatura de anelamento e 55°C e extensão a 72 °C por 1 minuto por 30 ciclos. O desenho do segmento de RNA dupla fita consistiu na escolha de um fragmento de 400 pb (SEQ ID NO 2), utilizando como molde a sequencia do cDNA da Vitelogenina. Foi utilizado o programa BLOCK-iT™ RNAi Designer (disponível em <http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress>), que analisa as seqüências e indica regiões de maior probabilidade para uso em silenciamento gênico.

[120] Os RNAs dupla fita foram sintetizados a partir de produtos das PCRs flanqueados pela sequencia mínima do promotor T7 (SEQ ID NO 18). Os produtos das PCRs foram clonados e sequenciados. Após a confirmação da sequencia a síntese de dsRNA foi realizada utilizando 0,5µg de produto de PCR como molde para um volume de reação de transcrição de 20 µL, conforme descrito no protocolo do manual do kit MEGAscript® T7 High Yield (Ambion). A reação foi incubada por 16 hs a 37°C, seguido por tratamento com DNase I RNase-free (Ambion, Invitrogen) por 15 minutos. Para alinhamento do RNA fita dupla, os produtos da reação foram incubados a 70°C por 5 minutos e resfriados em temperatura ambiente (22°C). Para purificação dos produtos da transcrição seguiu-se uma extração com fenol/clorofórmio e subsequente precipitação com álcool isopropílico, conforme protocolo descrito pelo fabricante do produto (Ambion). O dsRNA foi dissolvido em água tratada com DEPC, e a quantificação foi obtida por espectrofotometria.

[121] **Exemplo 2** – Bioensaios de microinjeção de dsRNA em *Anthonomus grandis*.

[122] Amostras de RNA dupla fita (dsRNA) foram utilizadas em bioensaios contra o bicudo do algodoeiro. O dsRNA foi preparado a partir de sequências identificadas conforme descrito no exemplo 1. Para os bioensaios de microinjeção, as moléculas de dsRNA, em todos os tratamentos, foram injetadas na região abdominal dorsal de fêmeas adultas com até 24 horas de emergência. Para a realização deste procedimento, houve necessidade de levantar um dos élitros para expor o local da microinjeção. Depois da injeção, as fêmeas foram mantidas em condições padrões de alimentação em dieta artificial e formados casais para permitir a cópula.

[123] Para avaliar o efeito do dsRNA sobre a expressão do transcrito alvo foi utilizada a técnica de PCR em tempo real e os genes de referência: GAPDH e beta-Actina. Nos ensaios de microinjeção visando o efeito de silenciamento da vitelogenina foram avaliadas algumas variáveis como descrito a seguir: 1- persistência do silenciamento gênico ao longo de 5 dias após a microinjeção; 2 – efeito do silenciamento gênico na oviposição de fêmeas de *A. grandis*; 3 – efeito do silenciamento gênico na viabilidade dos ovos do inseto.

[124] Cada unidade experimental consistiu em 15 fêmeas adultas microinjetadas e 10 machos adultos não microinjetados, o período experimental foi de 15 dias. O bioensaio consistiu em três réplicas biológicas com três réplicas técnicas. Os tratamentos controle consistiram na aplicação de dsRNA de um gene não relacionado, no caso, foi utilizado dsRNA com sequência do gene da Beta-glucuronidase (GUS) de *Escherichia coli*, e microinjeção de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) como controle técnico. Para analisar os dados obtidos nos bioensaios foi aplicada uma análise de variância, seguida do teste de comparações múltiplas de Turkey, ao nível de 5% de significância. Os resultados do bioensaio da microinjeção de dsRNA para Vitelogenina exibiram um efeito que culminou na infertilidade de fêmeas comparado aos controles, conforme descrito adiante.

[125] **Exemplo 3** – Resultados dos bioensaios de microinjeção de dsRNA e avaliação do silenciamento do gene para a proteína Vitelogenina em *A. grandis*.

[126] Foi identificado o fragmento de sequência de cDNA do gene da Vitelogenina de *A. grandis*, cujo tamanho foi de 400 nucleotídeos (SEQ ID NO 2), que serviu de molde para a

síntese de moléculas de dsRNA, conforme descrito no exemplo 1. Foi verificado por meio dos bioensaios de microinjeção e pelos resultados das análises de PCR em tempo real que as moléculas de dsRNA foram capazes de reduzir o número de transcritos da Vitelogenina (Figura 1). Também por análises de PCR em tempo real foi observado que em insetos adultos microinjeções de 500 ng de dsRNA foram suficientes para após 72 horas, causar redução drástica do número de transcritos (Figura 1).

[127] Na avaliação de parâmetros fenotípicos causados pela microinjeção do dsRNA da Vitelogenina, verificou-se que as fêmeas foram capazes de realizar oviposição da mesma forma que as fêmeas provenientes dos tratamentos controle (Figura 2), no entanto, 99% dos ovos eram completamente inviáveis (Figura 3). Além disso, estudos de microscopia, confirmaram o bloqueio no desenvolvimento do embrião no interior dos ovos, o que explica esta baixa viabilidade (Figura 4, Anexo 1).

[128] **Exemplo 4** - Desenvolvimento da construção gênica para a expressão de dsRNAs em planta de algodão (pBSK-AdsVitCHS)

[129] Para a presente invenção visando o efeito de silenciamento gênico dos genes da quitina sintase 2 (SEQ ID NO 16) e vitelogenina (SEQ ID NO 17) no controle do bicudo do algodoeiro, foi sintetizada uma construção gênica para a expressão de genes alvo em plantas de algodão geneticamente modificadas (Figura 7, SEQ ID NO 7), contendo as seguintes sequências: gene Ahas para expressão de Imazapyr (marcador para seleção das plantas geneticamente modificadas), sob regulação das sequências do promotor e terminador do gene Ahas); promotor UCEA1.7 (PI 0701230-6, SEQ ID No 9); da sequência sense específica para expressão de dsRNA de Quitina Sintase 2 do bicudo do algodoeiro (SEQ ID NO 1, BR 10 2012 033539-5); sequência sense específica para expressão de dsRNA de Vitelogenina de bicudo do algodoeiro (SEQ ID NO 2), íntron (SEQ ID No 11), sequência antisense específica para expressão de dsRNA de Quitina Sintase 2 do bicudo do algodoeiro (SEQ ID NO 3, BR 10 2012 033539-5); sequência antisense específica para expressão de dsRNA de Vitelogenina de bicudo do algodoeiro (SEQ ID NO 4) e o terminador de Nopalina sintase (tNOS - Depicker et al, 1982 (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. (1982) Nopaline synthase: transcript

mapping and DNA sequence. J. Mol. Appl.Genet.1: 561-573). A construção gênica possui no seu esqueleto a sequencia do plasmídeo pBSK contendo o gene bla, codificador de beta lactamase, o marcador mais utilizado em biologia molecular para resistência a Ampicilina (seleção de bactérias geneticamente transformadas). A referida construção (pBSK-AdsVitCHS) possui a seguinte disposição de partes na SEQ ID NO 7: Cassete Ahas: promotor AHAS+gene ahas+terminador ahas (674-6375pb da SEQ ID NO 7), Promotor UCEA1.7(6381-7392pb da SEQ ID NO 7), Fragmento do gene da Vitelogenina na orientação sense (7393-7569 pb da SEQ ID NO 7), Fragmento do gene da Quitina sintase 2 na orientação sense (7570-7754 pb da SEQ ID NO 7), intron Pdk (7755-8496 pb da SEQ ID NO 7), Fragmento do gene da Quitina sintase 2 na orientação reverso complementar (8535-8681 pb da SEQ ID NO 7), Fragmento do gene da Vitelogenina na orientação reverso complementar (8682-8858 pb da SEQ ID NO 7), Terminador-NOS (8859-9115 pb da SEQ ID NO 7), pBluescript II (1-673 pb da SEQ ID NO 7) e (9116-11340 pb da SEQ ID NO 7).

[130] A construção gênica pBSK-AdsVitCHS descrita acima (Figura 7, SEQ ID NO 7) foi inserida em plantas de algodão através da biobalística para obtenção das plantas de algodão geneticamente modificadas, para conferir resistência ao bicudo do algodoeiro.

[131] **Exemplo 5** – Desenvolvimento da construção gênica para a expressão de dsRNAs em conjunto com o gene para a toxina Cry8Ka5 em planta de algodão (pBSK-AdsVitCHS-Cry8).

[132] Para a presente invenção visando o efeito de silenciamento gênico dos genes da quitina sintase 2 (SEQ ID NO 16) e vitelogenina (SEQ ID NO 17) e super expressão de toxina Cry8ka5 (PI0906128-2, (SEQ ID No 5 - Cry8ka5 e SEQ ID No 6 - Cry8ka5_aa) no controle do bicudo do algodoeiro, foi sintetizada uma construção gênica para a expressão de genes alvo em plantas de algodão geneticamente modificadas (Figura 5, SEQ ID NO 8), contendo as seguintes sequencias: gene Ahas para expressão de Imazapyr (marcador para seleção das plantas geneticamente modificadas), sob regulação das sequencias do promotor e terminador do gene Ahas); promotor UCEA1.7 (PI 0701230-6); da sequencia sense específica para expressão de dsRNA de Quitina Sintase 2 do bicudo do algodoeiro (SEQ ID

NO 1, BR 10 2012 033539-5); sequencia sense específica para expressão de dsRNA de Vitelogenina de bicudo do algodoeiro (SEQ ID NO 2), íntron (SEQ ID No 11), sequencia antisense específica para expressão de dsRNA de Quitina Sintase 2 do bicudo do algodoeiro (SEQ ID NO 3, BR 10 2012 033539-5); sequencia antisense específica para expressão de dsRNA de Vitelogenina de bicudo do algodoeiro (SEQ ID NO 4), promotor GHPGFS1, isolado de plantas de Arabidopsis (BR 10 2012 015993-7, SEQ ID No 10), utilizado para direcionar a expressão da toxina Cry8ka5 para o botão floral e o terminador de Nopalina sintase (tNOS - Depicker et al, 1982 (DEPICKER A, STACHEL S, DHAESE P, ZAMBRYSKI P, GOODMAN HM. (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J. Mol. Appl.Genet.1: 561-573) A construção gênica possui no seu esqueleto a sequencia do plasmídeo pBSK contendo o gene bla, codificador de beta lactamase, o marcador mais utilizado em biologia molecular para resistência a Ampicilina (seleção de bactérias geneticamente transformadas). A referida construção (pBSK-AdsVitCHS-Cry8) possui a seguinte disposição de partes na SEQ ID NO 8: Cassete Ahas: promotor AHAS+gene ahas+terminador ahas (674-6375pb da SEQ ID NO 8), Promotor UCEA1.7(6381-7392pb da SEQ ID NO 8), Fragmento do gene da Vitelogenina na orientação sense (7393-7569 pb da SEQ ID NO 8), Fragmento do gene da Quitina sintase 2 na orientação sense (7570-7754 pb da SEQ ID NO 8), íntron Pdk (7755-8496 pb da SEQ ID NO 8), Fragmento do gene da Quitina sintase 2 na orientação reverso complementar (8535-8681 pb da SEQ ID NO 8), Fragmento do gene da Vitelogenina na orientação reverso complementar (8682-8858 pb da SEQ ID NO 8), Terminador-NOS (8859-9115 pb da SEQ ID NO 8), Promotor GhPGFS (9127-9893 pb da SEQ ID NO 8), Cry8ka5 + TagHis (9905-11870 pb da SEQ ID NO 8), terminador-NOS (11871-12130 pb da SEQ ID NO 8), pBluescript II (1-673 pb da SEQ ID NO 8) e (12131-14364 pb da SEQ ID NO 8).

[133] A construção gênica pBSK-AdsVitCHS-Cry8 descrita acima (Figura 5, SEQ ID NO 8) foi inserida em plantas de algodão através da biobalística para obtenção das plantas de algodão geneticamente modificadas, para conferir resistência ao bicudo do algodoeiro.

[134] **Exemplo 6** – Desenvolvimento da construção gênica para a expressão de dsRNA da quitina sintase em conjunto com o gene para a toxina Cry8Ka5 em planta de algodão pBSK-AdsCHS-Cry8

[135] Para a presente invenção visando o efeito de silenciamento gênico dos genes da quitina sintase 2 (SEQ ID NO 16) e super expressão de toxina Cry8ka5 (PI0906128-2, SEQ ID No 5 - Cry8ka5 e SEQ ID No 6 - Cry8ka5_aa) no controle do bicudo do algodoeiro, foi sintetizada uma construção gênica para a expressão de genes alvo em plantas de algodão geneticamente modificadas (Figura 8, SEQ ID NO 19), contendo as seguintes sequencias: gene Ahas para expressão de Imazapyr (marcador para seleção das plantas geneticamente modificadas), sob regulação das sequencias do promotor e terminador do gene Ahas); promotor UCEA1.7 (PI 0701230-6); da sequencia sense específica para expressão de dsRNA de Quitina Sintase 2 do bicudo do algodoeiro (SEQ ID NO 1, BR 10 2012 033539-5); íntron (SEQ ID No 11), sequencia antisense específica para expressão de dsRNA de Quitina Sintase 2 do bicudo do algodoeiro (SEQ ID NO 3, BR 10 2012 033539-5); promotor GHPGFS1, isolado de plantas de Arabidopsis (BR 10 2012 015993-7, SEQ ID No 10), utilizado para direcionar a expressão da toxina Cry8ka5 para o botão floral e o terminador de Nopalina sintase (tNOS - Depicker et al, 1982 (DEPICKER A, STACHEL S, DHAESE P, ZAMBRYSKI P, GOODMAN HM. (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J. Mol. Appl.Genet.1: 561-573) A construção gênica possui no seu esqueleto a sequencia do plasmídeo pBSK contendo o gene bla, codificador de beta lactamase, o marcador mais utilizado em biologia molecular para resistência a Ampicilina (seleção de bactérias geneticamente transformadas). A referida construção (pBSK-AdsCHS-Cry8) possui a seguinte disposição de partes na SEQ ID NO 19: Cassete Ahas: promotor AHAS+gene ahas+terminador ahas (639-6375 pb da SEQ ID NO 19), Promotor UCEA1.7(6381-7392 pb da SEQ ID NO 19), Fragmento do gene da Quitina sintase 2 na orientação sense (7358 – 7542 pb da SEQ ID NO 19), íntron Pdk (7543-8284 pb da SEQ ID NO 19), Fragmento do gene da Quitina sintase 2 na orientação reverso complementar (8285-8469 pb da SEQ ID NO 19), Terminador-NOS (8470-8726 pb da SEQ ID NO 19), Promotor GhPGFS (8738-9504 pb da SEQ ID NO 19), Cry8ka5 + TagHis (9511-11480 pb

da SEQ ID NO 19), terminador-NOS (11484-11740 pb da SEQ ID NO 19), pBluescript II (1-632 pb da SEQ ID NO 19) e (11741-13954 pb da SEQ ID NO 19).

[136] A construção gênica pBSK-AdsCHS-Cry8 descrita acima (Figura 8, SEQ ID NO 19) foi inserida em plantas de algodão através da biobalística para obtenção das plantas de algodão geneticamente modificadas, para conferir resistência ao bicudo do algodoeiro.

[137] **Exemplo 7** – Desenvolvimento da construção gênica para a expressão de dsRNA de vitelogenina em conjunto com o gene para a toxina Cry8Ka5 em planta de algodão pBSK-AdsVit-Cry8

[138] Para a presente invenção visando o efeito de silenciamento gênico do gene da vitelogenina (SEQ ID NO 17) e super expressão de toxina Cry8ka5 (PI0906128-2, SEQ ID No 5 - Cry8ka5 e SEQ ID No 6 - Cry8ka5_aa) no controle do bicudo do algodoeiro, foi sintetizada uma construção gênica para a expressão de genes alvo em plantas de algodão geneticamente modificadas (Figura 9, SEQ ID NO 20), contendo as seguintes sequências: gene Ahas para expressão de Imazapyr (marcador para seleção das plantas geneticamente modificadas), sob regulação das sequências do promotor e terminador do gene Ahas); promotor UCEA1.7 (PI 0701230-6); sequência sense específica para expressão de dsRNA de Vitelogenina de bicudo do algodoeiro (SEQ ID NO 2), íntron (SEQ ID No 11), sequência antisense específica para expressão de dsRNA de Vitelogenina de bicudo do algodoeiro (SEQ ID NO 4), promotor GHPGFS1, isolado de plantas de Arabidopsis (BR 10 2012 015993-7, SEQ ID No 10), utilizado para direcionar a expressão da toxina Cry8ka5 para o botão floral e o terminador de Nopalina sintase (tNOS - Depicker et al, 1982 (DEPICKER A, STACHEL S, DHAESE P, ZAMBRYSKI P, GOODMAN HM. (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J. Mol. Appl.Genet.1: 561-573) A construção gênica possui no seu esqueleto a sequência do plasmídeo pBSK contendo o gene bla, codificador de beta lactamase, o marcador mais utilizado em biologia molecular para resistência a Ampicilina (seleção de bactérias geneticamente transformadas). A referida construção (pBSK-AdsVit-Cry8) possui a seguinte disposição de partes na SEQ ID NO 20: Cassete Ahas: promotor AHAS+gene ahas+terminador ahas (639-6340 pb da SEQ ID NO 20), Promotor UCEA1.7(6347-7357 pb da SEQ ID NO 20),

Fragmento do gene da Vitelogenina na orientação sense (7358-7534 pb da SEQ ID NO 20), íntron Pdk (7535-8276 pb da SEQ ID NO 20), Fragmento do gene da Vitelogenina na orientação reverso complementar (8277-8453pb da SEQ ID NO 20), Terminador-NOS (8454-8710 pb da SEQ ID NO 20), Promotor GhPGFS (8724-9488 pb da SEQ ID NO 20), Cry8ka5 + TagHis (9494-11470 pb da SEQ ID NO 20), terminador-NOS (11471-11720 pb da SEQ ID NO 20), pBluescript II (1-632 pb da SEQ ID NO 20) e (11721-13938 pb da SEQ ID NO 20).

[139] A construção gênica pBSK-AdsVit-Cry8 descrita acima (Figura 9, SEQ ID NO 20) foi inserida em plantas de algodão através da biobalística para obtenção das plantas de algodão geneticamente modificadas, para conferir resistência ao bicudo do algodoeiro.

[140] **Exemplo 8** – Inserção das construções gênicas em plantas de algodão.

[141] O DNA plasmidial da construção gênica descrita no exemplo 5 foi digerido com a enzima de restrição BamH I e o fragmento compreendendo o cassete de expressão contendo os genes para Ahas, Cry8ka5 e dsRNA para Quitina Sintase 2 e Vitelogenina, foi analisado em eletroforese de gel de agarose 1%. Após a separação o fragmento de 11.460 pb foi eluído do gel por campo elétrico. A Figura 6 indica a presença da construção pBSK-AdsVitCHS-Cry8 através da amplificação com os oligos CHS2 e Vit (SEQ ID NO 14 e SEQ ID NO 15, respectivamente) gerando um fragmento de 300 pb. Alternativamente, o DNA plasmidial da construção gênica descrita no exemplo 4 foi digerido com a enzima de restrição BamH I e a enzima Kpn I e o fragmento compreendendo o cassete de expressão contendo os genes para Ahas, dsRNA para Quitina Sintase 2 e Vitelogenina, foi analisado em eletroforese de gel de agarose 1%. Após a separação o fragmento de 8442 pb foi eluído do gel por campo elétrico. A Figura 7 indica a esquema ilustrativo da construção pBSK-AdsVitCHS. O produto da eluição foi quantificado e os DNAs utilizados, separadamente, na metodologia de transformação genética via biobalística, conforme protocolo desenvolvido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por Rech et al., 2008 (RECH E.L.; VIANNA, G.R. & ARAGÃO, F.J.L. (2008). High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols*, 3: 410-418). As variedades de algodão utilizadas para o protocolo de transformação foram

Coker 310 e variedades da Embrapa. A seleção de transformantes in vitro foi realizado com o herbicida Imazapir e as plantas aclimatadas cultivadas em casa de vegetação para a caracterização molecular das progênies.

REIVINDICAÇÕES

1. Construção gênica caracterizada por compreender:
 - (i) um promotor funcional em planta;
 - (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
 - (iii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
 - (iv) uma seqüência separadora;
 - (v) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
 - (vi) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4; e
 - (vii) um terminador funcional em planta;
2. Construção gênica caracterizada por compreender:
 - (i) um promotor funcional em planta;
 - (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
 - (iii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
 - (iv) uma seqüência separadora;
 - (v) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
 - (vi) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;
 - (vii) um terminador funcional em planta; e alternativamente
 - (viii) um promotor funcional em planta;
 - (ix) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
 - (x) um terminador funcional em planta
3. Construção gênica caracterizada por compreender:
 - (i) um promotor funcional em planta;
 - (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 1;
 - (iii) uma seqüência separadora;

- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
 - (v) um terminador funcional em planta;
 - (vi) um promotor funcional em planta;
 - (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
 - (viii) um terminador funcional em planta.
4. Construção gênica caracterizada por compreender:
- (i) um promotor funcional em planta;
 - (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
 - (iii) uma seqüência separadora;
 - (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 4; e
 - (v) um terminador funcional em planta;
 - (vi) um promotor funcional em planta;
 - (vii) uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar à SEQ ID NO 5; e
 - (viii) um terminador funcional em planta.
5. Construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato do promotor funcional em plantas ser substancialmente similar à SEQ ID NO 9 ou SEQ ID NO 10.
6. Construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato da seqüência separadora ser um íntron.
7. Construção gênica de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato do íntron ser selecionado do grupo consistindo de íntron pdk, íntron catalase da mamona, íntron Delta 12 desnaturase de algodão, Delta 12 desnaturase de Arabidopsis, íntron ubiquitina de milho, íntron de SV40, íntrons do gene da malato sintase.
8. Construção gênica de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato do íntron ser substancialmente similar à SEQ ID NO 11.

9. Construção gênica de acordo com a qualquer uma das reivindicações 1, 5-8 caracterizada por possuir uma seqüência substancialmente similar à SEQ ID NO 7.
10. Construção gênica de acordo com a qualquer uma das reivindicações 2, 5-8 caracterizada por possuir uma seqüência substancialmente similar à SEQ ID NO 8.
11. Construção gênica de acordo com a qualquer uma das reivindicações 3, 5-8 caracterizada por possuir uma seqüência substancialmente similar à SEQ ID NO 19.
12. Construção gênica de acordo com a qualquer uma das reivindicações 4, 5-8 caracterizada por possuir uma seqüência substancialmente similar à SEQ ID NO 20.
13. Vetor compreendendo uma construção gênica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 12.
14. Vetor de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de o referido vetor ser capaz de promover a expressão da molécula de interesse ou um fragmento desta.
15. Célula transformada caracterizada por compreender uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12.
16. Célula de acordo com a reivindicação 15 caracterizada por ser uma célula procariótica.
17. Célula de acordo com a reivindicação 15 caracterizada por ser uma célula eucariótica.
18. Célula de acordo com a reivindicação 15 caracterizada por ser uma célula de vegetal ou bactéria.
19. Planta transformada caracterizada por compreender a construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12.
20. Planta de acordo com a reivindicação 19 caracterizada pelo fato da construção gênica ser expressa em uma célula vegetal, sob a forma de uma seqüência de ribonucleotídeo de filamento duplo, e a ingestão de dieta contendo uma quantidade inibidora, para inseto-praga, da referida seqüência do ribonucleotídeo de filamento duplo inibe ou reduz a proliferação da referida praga.
21. Planta de acordo com a reivindicação 19 caracterizada pelo fato da construção gênica ser expressa em uma célula vegetal, sob a forma de uma seqüência de ainda um agente pesticida produzido através da terceira região da construção gênica de acordo com a reivindicação 2 onde tal agente pesticida inibe ou reduz a proliferação da referida praga.

22. Planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-21 caracterizada pelo fato do inseto-praga ser selecionado pelo grupo consistindo de *Anthonomus grandis*, *Diabrotica virgifera* e *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum*, *Phoracantha semipunctata*, *Lixus angustatus*, *Acanthoscelides obtectus* e outros coleópteros que causam danos a madeiras e plantas agronomicamente importantes das famílias Scolytidae, Cerambycidae, Curculionidae e Bostrichida.
23. Produto caracterizado pelo fato de ser produzido a partir de uma planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-21 onde o referido produto comercializável compreende uma quantidade detectável da construção gênica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1-12 ou de um ribonucleotídeo ou de uma proteína expressa a partir da mesma.
24. Método para produzir plantas transgênicas capazes de produzir dsRNA de interesse a fim de que o inseto-praga, ao nutrir-se destas plantas, tenham gene alvo silenciado, caracterizado por compreender os estágios de:
 - I) prover uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12;
 - II) inserir a molécula obtida em "I" em célula ou células do organismo para produzir uma célula ou células transgênicas; e
 - III) crescer ou regenerar um organismo eucarioto transgênico da célula ou células transgênicas.
25. Método para controle de insetos-praga caracterizado por compreender a disponibilização, na dieta de um inseto-praga, de um agente compreendendo uma seqüência de ribonucleotídeo de filamento duplo produzida através construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12.
26. Método de acordo com a reivindicação 25 caracterizado pelo fato da célula do organismo eucarioto compreender ainda um agente pesticida produzido através da construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-12.
27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 24-26 caracterizado pelo fato do inseto praga ser selecionado do grupo consistindo de *Anthonomus grandis*, *Diabrotica virgifera*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum*, *Phoracantha semipunctata*, *Lixus angustatus*, *Acanthoscelides obtectus* e outros coleópteros que causam danos a madeiras e

plantas agronomicamente importantes das famílias Scolytidae, Cerambycidae, Curculionidae e Bostrichida.

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 24-26 caracterizado pelo fato que o modo de atuação da sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo, ao ser ingerida pela praga, é o de supressão ou redução da expressão de um gene que execute uma função essencial para sobrevivência do inseto.
29. Método de acordo com a reivindicação 28 caracterizado pelo fato da função essencial para sobrevivência do inseto ser selecionada do grupo de apoptose celular, diferenciação e desenvolvimento celular, formação do ovo, maturação larval, transição de estágio larval, pupação, divisão celular, metabolismo energético, respiração e formação e endurecimento da cutícula.
30. Método para melhorar o rendimento de plantas cultivadas, sujeitas à infestação por insetos-praga, caracterizado por compreender as etapas de:
 - a. Obtenção de planta transgênica a partir da introdução de uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12 na referida planta;
 - b. Cultivo da planta obtida em "a" de modo que esta expresse as sequências da referida construção gênica, a fim de que os produtos desta expressão reduzam ou suprimam a população dos insetos-praga.
31. Método de acordo com a reivindicação 30 caracterizado pelo fato da expressão das sequências sense e antisense das referidas construções gênicas produzirem moléculas de RNA que suprimem, pelo mesmo, um primeiro e um segundo gene alvo em um inseto-praga que ingeriu uma porção da referida planta onde os genes alvo exercem pelo menos uma função essencial para sobrevivência do inseto ser selecionada do grupo de apoptose celular, diferenciação e desenvolvimento celular, formação do ovo, maturação larval, transição de estágio larval, pupação, divisão celular, metabolismo energético, respiração e formação e endurecimento da cutícula.
32. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 ou 31 caracterizado pelo fato do inseto-praga ser selecionado do grupo consistindo de *Anthonomus grandis*, *Diabrotica virgifera*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum*, *Phoracantha semipunctata*, *Lixus*

angustatus, *Acanthoscelides obtectus* e outros coleópteros que causam danos a madeiras e plantas agronomicamente importantes das famílias Scolytidae, Cerambycidae, Curculionidae e Bostrichida.

33. Método de produção de um produto caracterizado pelo fato de compreender a obtenção de uma planta definida de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-22, ou parte da mesma, e o seu preparo a partir do todo ou parte desta planta, a fim de que este seja disponibilizado na dieta de insetos de interesse, visando a redução ou supressão de sua.
34. Método de produção de alimento ou ração caracterizado pelo fato de compreender a obtenção de uma planta definida de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-22, ou parte da mesma, e o preparo de alimento ou ração a partir da referida planta ou parte da mesma
35. Par isolado de iniciadores de ácido nucleico compreendendo uma primeira e segunda molécula de ácido nucleico capaz de amplificar uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12.
36. Par isolado de iniciadores de acordo com a reivindicação 31 caracterizado pelo fato da primeira molécula de ácido nucleico ser substancialmente similar à SEQ ID NO 12 e a segunda molécula de ácido nucleico ser substancialmente similar à SEQ ID NO 13.
37. Par isolado de iniciadores de acordo com a reivindicação 35 ou 36 caracterizado pelo fato de amplificarem uma molécula de ácido nucleico sendo substancialmente similar à SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20.
38. Kit para identificar uma molécula de ácido nucleico de uma amostra biológica caracterizado por compreender um primeiro e segundo iniciador de ácido nucleico onde o primeiro e segundo iniciador de ácido nucleico são capazes de amplificar uma molécula substancialmente similar à SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas.
39. Método de identificar uma planta contendo a construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12 caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a. Formar uma mistura compreendendo uma amostra biológica contendo DNA de planta e um primeiro e segundo iniciador de ácido nucleico capaz de amplificar uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas;
 - b. Reagir a mistura sob condições que permitem ao primeiro e segundo iniciadores amplificar uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas;
 - e
 - c. Detectar a presença de um fragmento amplificado de uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas, onde a presença da molécula de ácido nucleico específica na planta indica que esta é um evento de planta geneticamente modificada.
40. Método de identificar uma planta contendo a construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12 caracterizado por compreender as seguintes etapas:
- a. Formar uma mistura compreendendo uma amostra biológica contendo um DNA de planta e uma sonda de molécula de ácido nucleico capaz de hibridizar a uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas;
 - b. Reagir a mistura sob condições que permitem a sonda da molécula de ácido nucleico hibridizar a uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas; e
 - c. Detectar a hibridização da sonda ao DNA, onde a presença de hibridização da sonda da molécula de ácido nucleico ao DNA de planta indica que esta é um evento de planta geneticamente modificada.
41. Método de reprodução de uma planta resistente a insetos-praga caracterizado por compreender as seguintes etapas;

- a. Cruzar uma planta compreendendo uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas com uma segunda planta;
 - b. Obter semente do cruzamento do passo (a);
 - c. Obter uma amostra de DNA do embrião da semente; e
 - d. Detectar a presença de uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas, onde a presença desta indica que a semente é capaz de produzir uma planta resistente a inseto-praga.
42. Método de acordo com a reivindicação 41 caracterizado pelo fato do inseto praga ser o *Anthonomus grandis*.
43. Um método para cultivar planta caracterizado por compreender as seguintes etapas:
- a. Prover semente ou muda compreendendo uma molécula de ácido nucleico substancialmente similar à SEQ ID No 7 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 19 ou SEQ ID NO 20 ou fragmento das mesmas;
 - b. Plantar ou semear o material obtido na etapa (a) em substrato, solo ou ambiente propício à germinação ou brotação, crescimento e desenvolvimento adequados visando a produção vegetal, consubstanciando-se, o conjunto, em sistema de cultivo onde são controladas populações de insetos-praga.

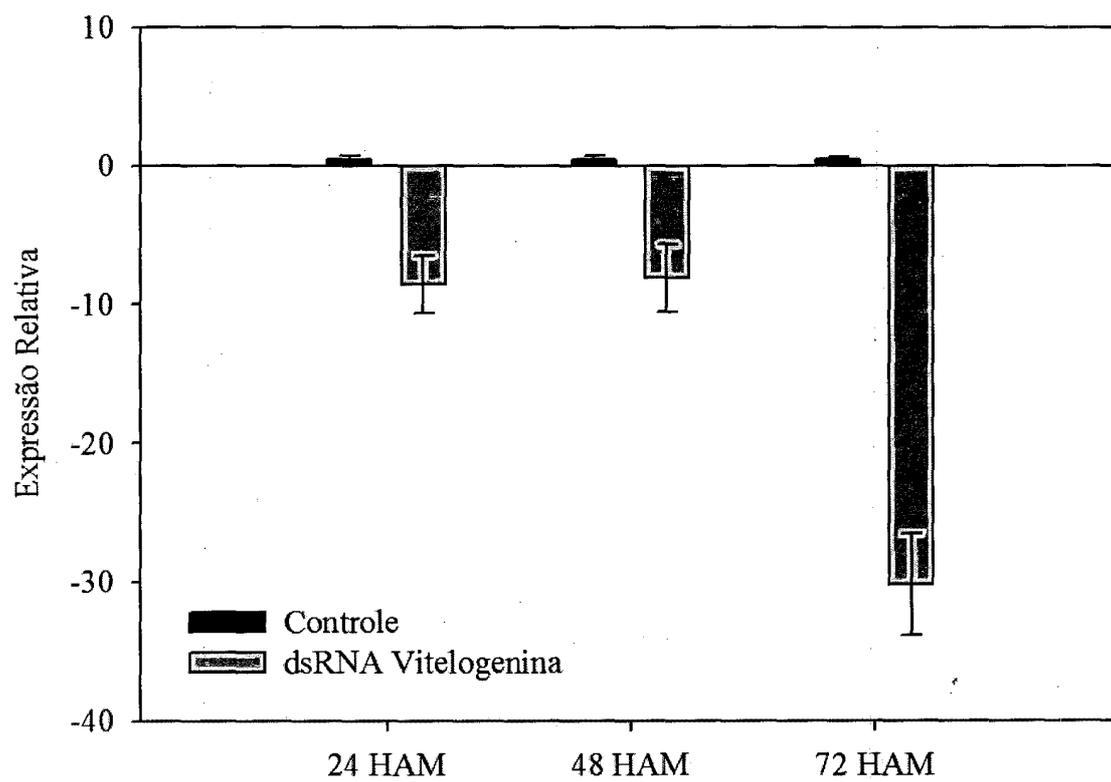


FIG. 1

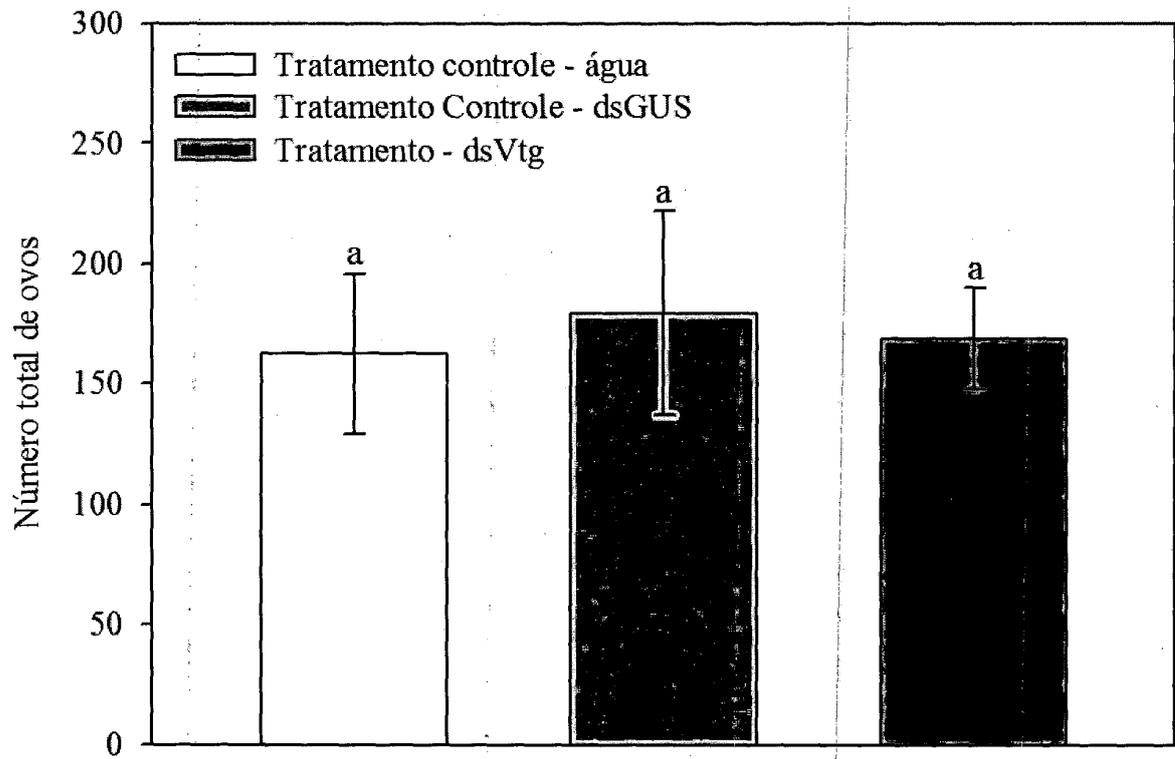


FIG. 2

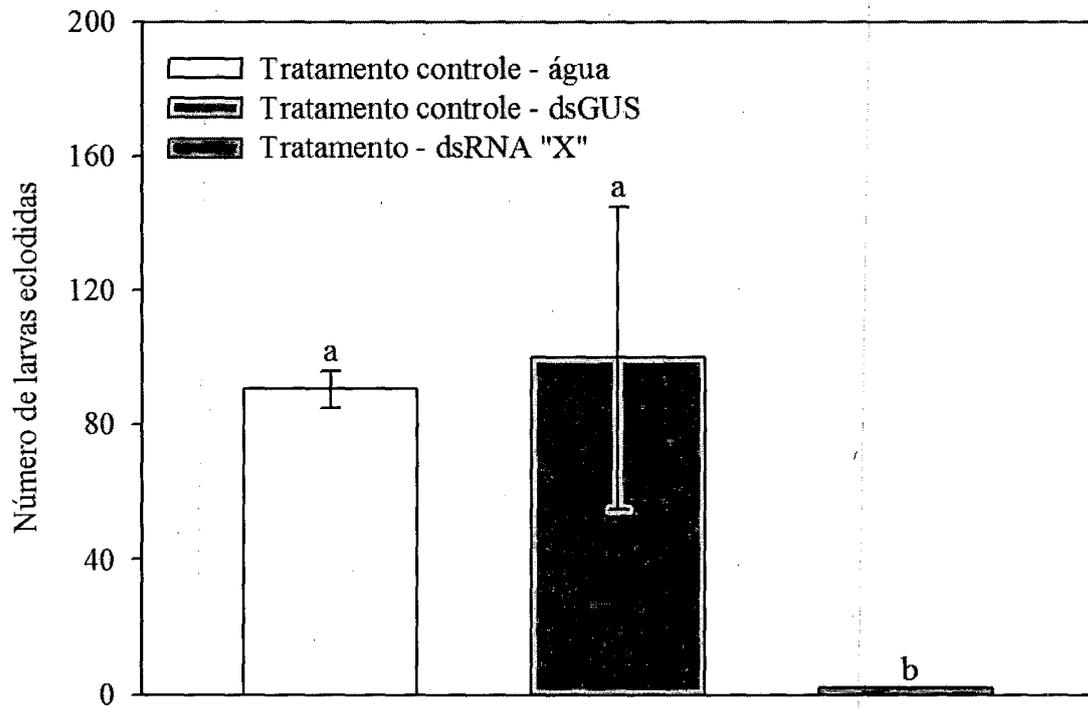
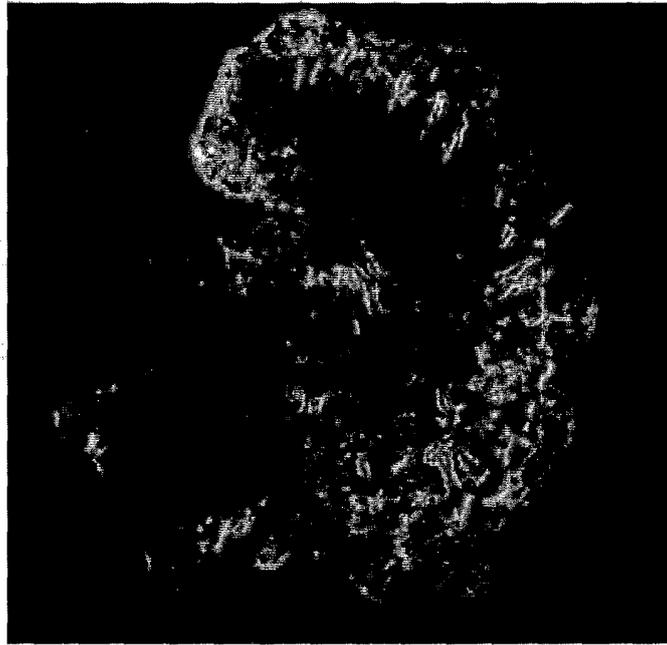
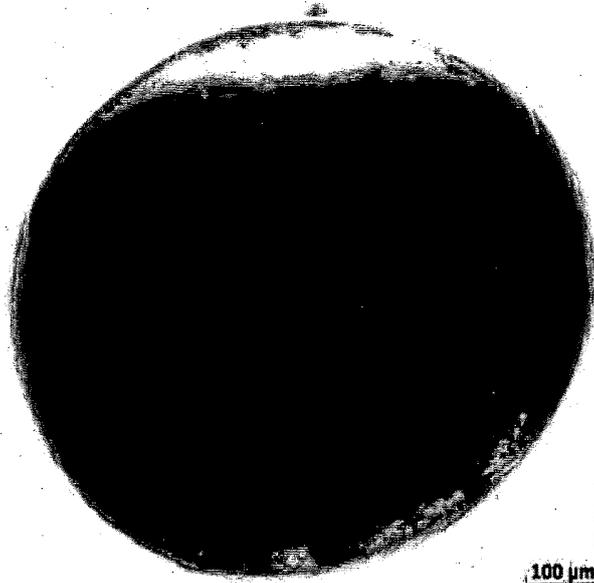


FIG. 3



(A)



(B)

FIG. 4

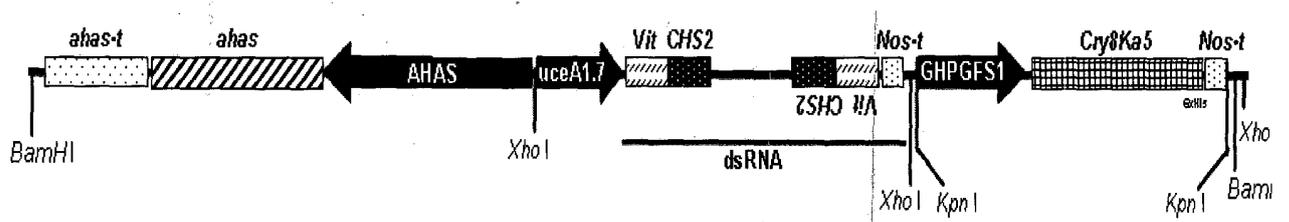


FIG. 5

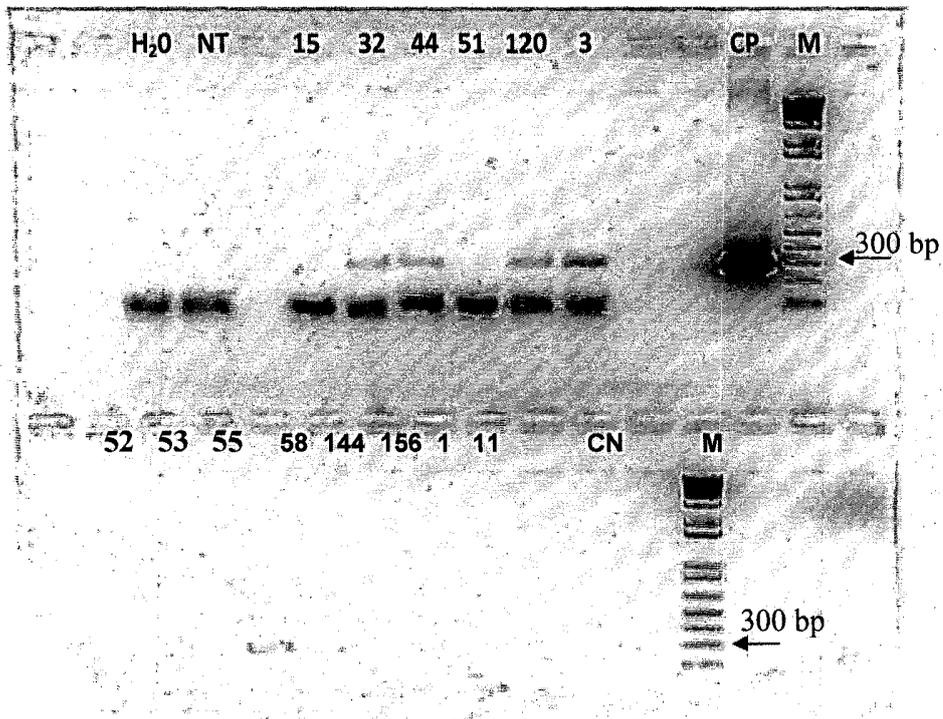


FIG. 6

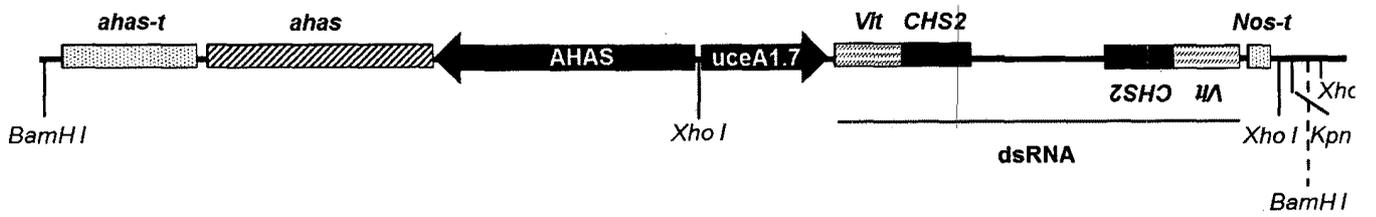


FIG. 7

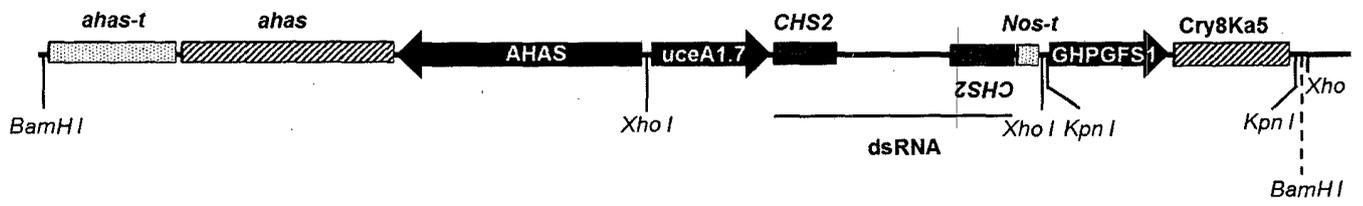


FIG. 8

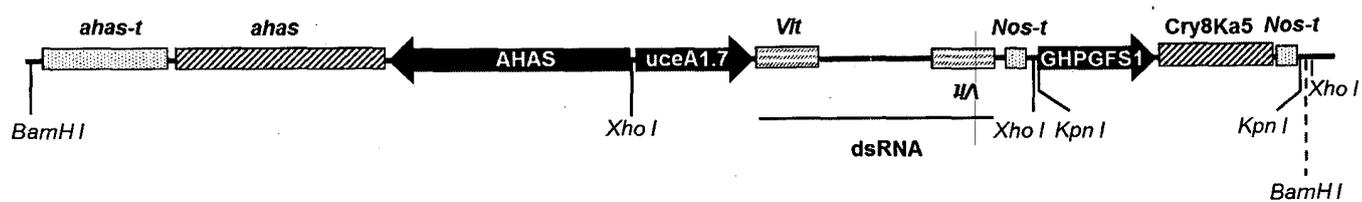


FIG. 9

RESUMO**MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE DE INSETOS-PRAGA EM PLANTAS POR MEIO DO SILENCIAMENTO DE GENES DA FAMÍLIA DA QUITINA SINTASE E DA VITELOGENINA BEM COMO ALTERNATIVAMENTE PELA EXPRESSÃO DO GENE DE UMA TOXINA CRY.**

A presente invenção está relacionada ao controle de infestação de praga através da inibição ou redução da expressão de genes da família da quitina sintase e da vitelogenina bem como através da expressão da toxina Cry8ka5. A invenção provê ainda métodos e composições para o controle de pragas, através da alimentação de uma ou mais moléculas de RNA de fita dupla provida pela presente invenção bem como através da ação da toxina Cry8ka5 sobre os insetos-alvo. A invenção descreve ainda um método de obtenção de plantas transgênicas que expressem moléculas de RNA de fita dupla e a proteína tóxica Cry8ka5. A presente invenção é preferencialmente utilizada para plantas de algodoeiro.