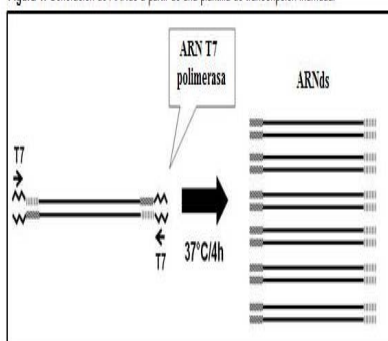


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

Figura 1. Generación de ARNds a partir de una plantilla de transcripción individual



1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
	MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO RNAPII 140 QUE CONFIEREN RESISTENCIA A PLAGAS DE COLEÓPTEROS		
2	Datos del Solicitante		
	Nombre:	DOW AGROSCIENCES LLC	Dirección Electrónica:
			clientes@cavelier.com
	Dirección:	9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América	Domicilio/País de constitución:
			ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - INDIANA - INDIANAPOLIS
	Identificación:		
	☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT

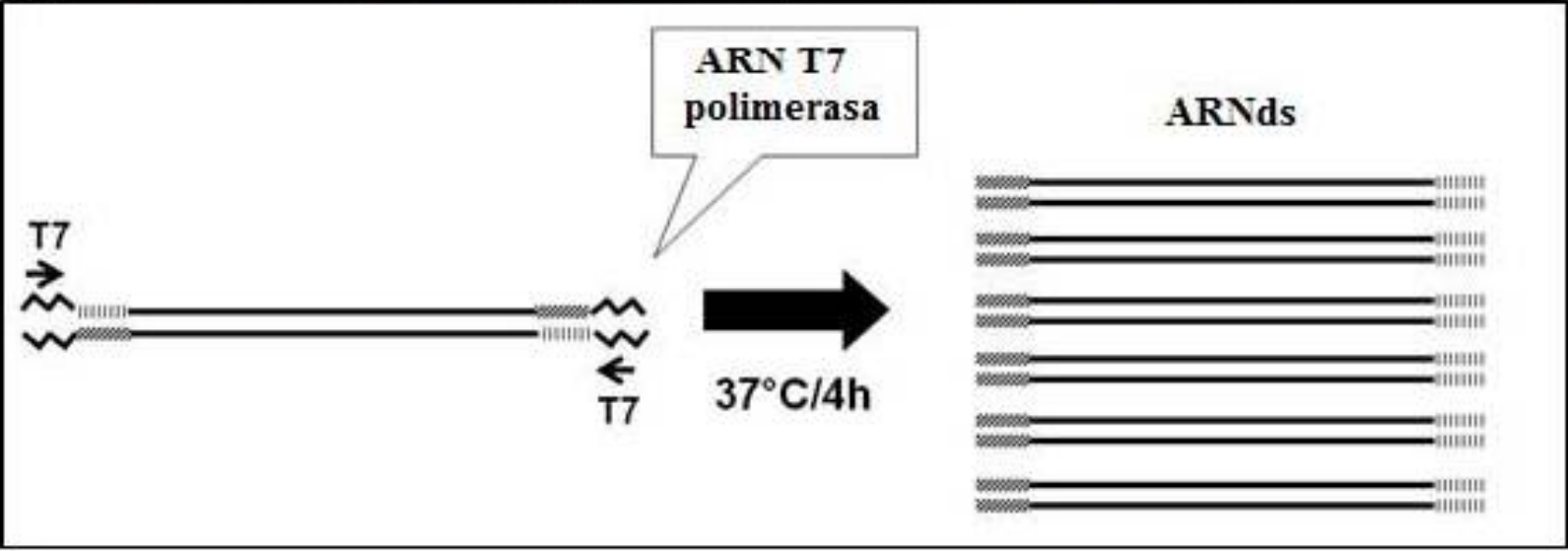
Número: 1020340-															
3	Solicitantes														
<table><tr><th>Apellidos - Nombres o Razón Social</th><th>Tipo</th><th>Identificación</th></tr><tr><td>1. DOW AGROSCIENCES LLC</td><td>EE</td><td>1020340</td></tr><tr><td>2. FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E. V.</td><td>EE</td><td>516861775157</td></tr></table>				Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación	1. DOW AGROSCIENCES LLC	EE	1020340	2. FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E. V.	EE	516861775157			
Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación													
1. DOW AGROSCIENCES LLC	EE	1020340													
2. FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E. V.	EE	516861775157													
4	Datos del Inventor														
Nombre:		Kenneth E. NARVA	Dirección Electrónica:	clientes@cavelier.com											
Dirección:		9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - INDIANA - INDIANAPOLIS											
Identificación:															
☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT ☒ No Aplica													
Número:		-													
5	Inventor(es)														
<table><tr><th>Apellidos - Nombres</th><th>Domicilio</th></tr><tr><td>1. NARVA Kenneth E.</td><td>ESTADOS UNIDOS DE AMERICA</td></tr><tr><td>2. ARORA Kanika</td><td>ESTADOS UNIDOS DE AMERICA</td></tr><tr><td>3. RANGASAMY Murugesan</td><td>ESTADOS UNIDOS DE AMERICA</td></tr><tr><td>4. VEERAMANI Balaji</td><td>ESTADOS UNIDOS DE AMERICA</td></tr><tr><td>5. GANDRA Premchand</td><td>ESTADOS UNIDOS DE AMERICA</td></tr></table>				Apellidos - Nombres	Domicilio	1. NARVA Kenneth E.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	2. ARORA Kanika	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	3. RANGASAMY Murugesan	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	4. VEERAMANI Balaji	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	5. GANDRA Premchand	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Apellidos - Nombres	Domicilio														
1. NARVA Kenneth E.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA														
2. ARORA Kanika	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA														
3. RANGASAMY Murugesan	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA														
4. VEERAMANI Balaji	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA														
5. GANDRA Premchand	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA														

6.	WORDEN Sarah E.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
7.	LI Huarong	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
8.	VILCINSKAS Andreas	ALEMANIA		
9.	KNORR Eileen	ALEMANIA		
6	Datos Inventor(es)			
	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América
3.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América
5.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América
6.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América

7.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América
8.	ALEMANIA	HESSEN	GIEßEN	Winchesterstr. 2, 35394 Giessen, Alemania
9.	ALEMANIA	HESSEN	GIEßEN	Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Alemania
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		JOSE ANDRES RINCON USCATEGUI	Dirección Electrónica:	cavelier@cavelier.com
Dirección:		CARRERA. 4 No. 72-35	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - CUNDINAMARCA - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE Número: 79780910-		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT		
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/US2014/071583	Fecha Solicitud:	19/12/2014
Número Publicacion:		WO 2015/095750 A1	Fecha Publicacion:	25/06/2015
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	Codigo del país US	(31) No. Solicitud 61/919,239	(32) Fecha 20/12/2013

10	Reivindicaciones		
Número reivindicaciones:		33	Pago Reivindicaciones: No
11	Reducción de tasas.		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
12	Documentos Anexos		
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☒ Listado de secuencias ☒ Artes finales 12 x 12 cm ☒ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos			

Figura 1. Generación de ARNds a partir de una plantilla de transcripción individual



MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO RNAPII 140 QUE CONFIEREN RESISTENCIA A PLAGAS DE COLEÓPTEROS

RECLAMO DE PRIORIDAD

5

Esta solicitud reclama el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud de patente de los Estados Unidos número 61/919,239, presentada el 20 de diciembre de 2013, para "MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO RNAPII 140 QUE CONFIEREN
10 RESISTENCIA A PLAGAS DE COLEÓPTEROS".

CAMPO TÉCNICO

La presente divulgación se refiere generalmente a
15 control de daños a plantas causados por plagas de coleópteros. En modalidades particulares, la presente divulgación se refiere a la identificación de codificación objetivos y secuencias de no codificación, y el uso de tecnologías de ácido nucleico para reprimir o inhibir después
20 de la transcripción la expresión de la codificación objetivo y las secuencias de no codificación en las células de una plaga de coleópteros para proporcionar un efecto protector a la planta.

25

ANTECEDENTES

La crisomela del maíz del oeste (WCR por sus siglas en inglés), *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, es una de las especies de gusanos de raíz del maíz más devastadoras en América del norte y es una preocupación particular en zonas de cultivo de maíz del medio oeste de Estados Unidos. La crisomela del maíz del norte (NCR por sus siglas en inglés), *Diabrotica barberi* Smith y Lawrence, es una especie estrechamente relacionada que co-habita en mucho del mismo rango que WCR. Hay varias otras subespecies de *Diabrotica* que son plagas importantes en América del Norte: la crisomela del maíz mexicana (MCR por sus siglas en inglés), *D. virgifera zea* Krysan y Smith; la crisomela del maíz del sur (SCR), *D. undecimpunctata howardi* Barber; *D. balteata* LeConte; *D. undecimpunctata tenella*; y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim. Actualmente, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos calcula que las crisomelas del maíz causan \$ 1 billón en pérdida de ingresos cada año, incluyendo \$ 800 millones en pérdidas de rendimiento y \$ 200 millones en costos de tratamiento.

Los huevos de WCR y NCR son depositados en la tierra durante el verano. Los insectos permanecen en la fase de huevo durante el invierno. Los huevos son oblongos, blancos y menores a 0.010 cm de longitud. La eclosión de larvas a finales de mayo o principios de junio, con la sincronización exacta de la eclosión del huevo varía de año

en año debido a la ubicación y las diferencias de temperatura. Las larvas recién nacidas son gusanos blancos que son menores a 0.3175 cm de longitud. Una vez eclosionadas, las larvas comienzan a alimentarse de las raíces del maíz. Las crisomelas del maíz pasan por tres instares larvales. Después de alimentarse durante varias semanas, la larva muda a la etapa pupal. Forman pupas en la tierra, y luego emergen de la tierra como adultos en julio y agosto. Las crisomelas adultas son de unos 0.635 cm de longitud.

Las larvas de crisomela del maíz completan el desarrollo en el maíz y varias otras especies de gramíneas. Las larvas criadas en césped amarillo emergen más tarde y tienen un tamaño de cápsula de cabeza más pequeño como adultos que las larvas cultivadas en el maíz. Ellsbury et al. (2005) *Environ. Entomol.* 34:627-634. Las WCR adultas se alimentan de seda de maíz, polen y granos en puntas expuestas. Si las WCR adultas surgen antes de que los tejidos reproductivos del maíz estén presentes, se pueden alimentar de tejido foliar, con lo que aminorarán el crecimiento vegetal y en ocasiones matarán a la planta anfitriona. Sin embargo, los adultos desplazarán rápidamente al polen y sedas preferidas cuando estén disponibles. Las NCR adultas también se alimentan de los tejidos reproductivos de la planta de maíz, pero en cambio rara vez se alimentan de hojas de maíz.

La mayoría de los daños de la crisomela del maíz

son causados por la alimentación larval. Las crisomelas recién eclosionadas inicialmente se alimentan de pelos de raíz de maíz finos y hacen madrigueras en ápices. A medida que las larvas crecen más grandes, se alimentan y se entierran en raíces primarias. Cuando las crisomelas del maíz son abundantes, la alimentación larval a menudo resulta en la poda de raíces hasta la base del tallo del maíz. La lesión severa de la raíz interfiere con la habilidad de las raíces para transportar agua y nutrientes a la planta, reduce el crecimiento de las plantas y resulta en la producción reducida de granos, reduciendo de tal modo a menudo drásticamente el rendimiento general. La lesión severa de la raíz también resulta a menudo en el alojamiento de plantas de maíz, lo que hace más difícil la cosecha y el rendimiento disminuye aún más. Además, la alimentación de los adultos sobre los tejidos reproductivos del maíz puede resultar en la poda de las sedas en la punta. Si este "recorte de seda" es lo suficientemente severo durante el cobertizo de polen, la polinización puede interrumpirse.

El control de las crisomelas del maíz puede ser intentado por la rotación de cultivos, los insecticidas químicos, biopesticidas (por ejemplo, la espora que forma bacterias gram positivas, *Bacillus thuringiensis*) o una combinación de estos. La rotación de cultivos sufre la desventaja significativa de colocar restricciones no deseadas sobre el uso de las tierras de labrantío. Por otra parte, la oviposición de algunas especies de crisomelas puede darse en

cultivos de soya, mitigando así la efectividad de la rotación de cultivos practicada con maíz y soya.

Los escarabajos europeos del polen (EPB) son plagas graves en la colza oleaginosa, tanto las larvas como los
5 adultos se alimentan de las flores y el polen. El daño del escarabajo del polen al cultivo puede causar pérdida de rendimiento de 20-40%. La especie de plaga primaria es *Meligethes aeneus*. En la actualidad, control del escarabajo del polen en la colza oleaginosa se basa principalmente en
10 los piretroides que se espera sean eliminados pronto debido a su perfil ambiental y regulatorio. Por otra parte, se ha reportado la resistencia del escarabajo de polen a los insecticidas químicos existentes. Por lo tanto, se necesitan con urgencia soluciones de control del escarabajo del polen
15 con nuevos modos de acción.

En la naturaleza, los escarabajos del polen hibernan como los adultos en la tierra o debajo de la hojarasca. En primavera los adultos emergen de la hibernación y comienzan a alimentarse de las flores de las
20 malezas y migran hacia plantas de colza oleaginosa. Los huevos son depositados en brotes de flores de colza oleaginosa. Las larvas se alimentan y desarrollan en los brotes y las flores. La etapa de larvas tardía encuentra un sitio de pupas en la tierra. La segunda generación de adultos
25 emerge en julio y agosto y se alimenta de diversas plantas de floración antes de encontrar los sitios de invernada.

Los insecticidas químicos son la estrategia más

confiada para lograr el control de las crisomelas del maíz. El uso de insecticidas químicos, sin embargo, es una estrategia de control imperfecta de la crisomela del maíz; aproximadamente \$ 1 billón se pueden perder en los Estados Unidos cada año debido a las crisomelas del maíz cuando los costos de los insecticidas químicos se agregan a los costos del daño por las crisomelas del maíz que pueden ocurrir a pesar del uso de los insecticidas. Las altas poblaciones de larvas, las fuertes lluvias y un uso incorrecto del (los) insecticida(s) pueden resultar en un control inadecuado de las crisomelas del maíz. Además, el uso continuo de insecticidas puede seleccionarse para cepas de crisomelas del maíz resistentes al insecticida, así como plantear preocupaciones ambientales significativas debido a la toxicidad de muchos de ellos a especies no objetivo.

El ARN de interferencia (ARNi) es un proceso que utiliza las vías celulares endógenas, en donde una molécula de ARN (ARNi) de interferencia (por ejemplo, una molécula de ARNs) que es específica para todos, o cualquier porción del tamaño adecuado, de una secuencia del gen objetivo resulta en la degradación del ARNm codificado de tal modo. En los últimos años se ha utilizado ARNi para realizar "noqueo" genético en un número de especies y sistemas experimentales; por ejemplo, *Caenorhabditis elegans*, plantas, embriones de insectos y células en cultivo de tejidos. Véase, por ejemplo, Fire et al. (1998) *Nature* 391:806 811; Martinez et al. (2002) *Cell* 110:563 574; McManus y Sharp (2002) *Nature*

Rev. Genetics 3:737 747.

El ARNi logra la degradación del ARNm a través de una vía endógena, incluyendo el complejo de la proteína DICER. DICER escinde largas moléculas de ARNds en fragmentos cortos de aproximadamente 20 nucleótidos, denominados ARN
5 interferente pequeño (ARNsi). Los ARNsi se desenrollan en dos ARNs de una sola hebra: la hebra pasajera y la hebra guía. La hebra pasajera se degrada y la hebra guía se incorpora en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC).
10 Las micro moléculas inhibidoras de ácido ribonucleico (ARNmi) pueden ser igualmente incorporadas en RISC. El silenciamiento post transcripcional se produce cuando la hebra guía se une específicamente a una secuencia complementaria de una molécula de ARNm e induce escisión por Argonaute, el
15 componente catalítico de los complejos de RISC. Este proceso se conoce por difundirse sistemáticamente en todo el organismo a pesar de las concentraciones inicialmente limitadas de ARNsi y/o ARNmi en algunos eucariotas tales como plantas, nematodos y algunos insectos.

20 Sólo las transcripciones complementarias a los ARNsi o ARNmi son escindidas y degradadas, y por lo tanto el noqueo de la expresión de ARNm es específico de secuencia. En las plantas, existen varios grupos funcionales de genes DICER. El efecto de gen silenciador del ARNi persiste por
25 días y, en condiciones experimentales, puede conducir a una disminución de la abundancia de la transcripción objetivo de 90% o más, con la consiguiente reducción de los niveles de la

proteína correspondiente.

La patente estadounidense No. 7,612,194 y las publicaciones de patente estadounidenses Nos. 2007/0050860, 2010/0192265, y 2011/0154545 divulgan una biblioteca de 9112
5 marcas de secuencia expresadas (EST) de secuencias aisladas de *D. v. virgifera* LeConte pupae. Se sugiere en la patente estadounidense No. 7,612,194 y la publicación de patente estadounidense No. 2007/0050860 vincular operativamente a un promotor de una molécula de ácido nucleico que es
10 complementaria a una de varias secuencias parciales particulares de *D. v. virgifera* vacuolar tipo H + ATPasa (V-ATPasa) divulgada en esos documentos para la expresión de ARN antisentido en las células vegetales. La publicación de patente estadounidense No. 2010/0192265 sugiere vincular
15 operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia parcial de un gen de *D. v. virgifera* de función desconocida y no divulgada (la secuencia parcial se indica que es 58% idéntica al producto del gen C56C10.3 en *C. elegans*) para la expresión de ARN anti
20 sentido en las células vegetales. La publicación de patente estadounidense No. 2011/0154545 sugiere vincular operativamente a un promotor de una molécula de ácido nucleico que es complementaria a dos secuencias parciales particulares de genes de la subunidad beta de coatómero de *D.*
25 *v. virgifera* para la expresión de ARN anti sentido en las células vegetales. Además, la patente estadounidense No. 7,943,819 divulga una biblioteca de 906 marcas de secuencia

expresada (EST) de secuencias aisladas de larvas, pupas e intestinos medios disecados de *D. v. virgifera* LeConte y sugiere vincular operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia parcial de un gen 4b de proteína de cuerpo multivesicular cargado con *D. v. virgifera* para la expresión de ARN de doble hebra en las células vegetales.

Ninguna otra sugerencia es proporcionada en la patente estadounidense No. 7,612,194 y la publicaciones de patente estadounidenses Nos. 2007/0050860, 0192265/2010 y 2011/0154545 sobre el uso de cualquier secuencia particular de las más de nueve mil secuencias listadas en los mismos para la interferencia del ARN, aparte de las varias secuencias parciales particulares de VATpasa y las secuencias parciales particulares de genes de función desconocida. Además, ninguna de las patentes estadounidenses Nos. 7,612,194 y las publicaciones de patentes estadounidenses Nos. 2007/0050860 y 0192265/2010 y 2011/0154545 proporcionan orientación alguna en cuanto a que otras de las más de nueve mil secuencias proporcionadas sería letal, o incluso de otra manera útil, en especies de crisomelas del maíz cuando se utiliza como ARNs o ARNs_i. La patente estadounidense No. 7,943,819 no proporciona ninguna sugerencia para utilizar cualquier secuencia particular de las más de novecientas secuencias listadas en la misma para la interferencia del ARN, además de la secuencia parcial particular de un gen 4b de proteína de cuerpo corporal cargado. Además, la patente

estadounidense No. 7,943,819 no proporciona orientación alguna en cuanto a cuáles otras de las más de nueve mil secuencias proporcionadas sería letal, o incluso de otra manera útil, en especies de crisomelas del maíz cuando se utiliza como ARNds o ARNsi. La publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2013/040173 y la publicación de solicitud PCT No. WO 2013/169923 describen el uso de una secuencia derivada de un gen Snf7 de *Diabrotica virgifera* para la interferencia del ARN en el maíz. (También divulgado en Bolognesi et al. (2012) PLoS ONE 7(10): e47534. doi:10.1371/journal.pone.0047534).

La inmensa mayoría de las secuencias complementarias al ADN de las crisomelas del maíz (tal como las anteriores) no es letal en especies de crisomelas del maíz cuando se utilizan como ARNds o ARNsi. Por ejemplo, Baum et al. (2007, *Nature Biotechnology* 25:1322-1326), describe los efectos de la inhibición de diversos objetivos genéticos de WCR por el ARNi. Estos autores reportaron que 8 de 26 genes objetivo que probaron no fueron capaces de proporcionar experimentalmente significativa mortalidad de plagas de coleópteros en una concentración muy alta de ARNi (por ejemplo, ARNds) de más de 520 ng/cm².

DESCRIPCIÓN

25

En este documento se divulgan moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, genes objetivo, ADNs, ARNi, ARNds,

ARNsi, ARNmi, ARNsh y ARNhp) y métodos de uso de las mismas, para el control de plagas de coleópteros, incluyendo, por ejemplo *D. v. virgifera* LeConte (crisomela del maíz del oeste, "WCR"); *D. barberi* Smith y Lawrence (crisomela del maíz del norte, "NCR"); *D. u. howardi* Barber (crisomela del maíz del sur, "SCR"); *D. v. zea* Krysan y Smith (crisomela del maíz mexicana, "MCR"); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; *Meligethes aeneus* Fabricius (escarabajo del polen, "PB"). En ejemplos particulares, se divulgan moléculas ejemplares de ácido nucleico que pueden ser homólogas a por lo menos una parte de una o más secuencias nativas de ácidos nucleicos en una plaga de coleópteros.

En estos y otros ejemplos, la secuencia de ácido nucleico nativa puede ser un gen objetivo, cuyos productos pueden ser, por ejemplo y sin limitación: implicados en un proceso metabólico; implicados en un proceso reproductivo; o implicados en el desarrollo larval. En algunos ejemplos, la inhibición post traslacional de la expresión de un gen objetivo por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia homóloga correspondiente puede ser letal en plagas de coleópteros o resultar en la reducción del crecimiento o reproducción. En ejemplos específicos, se puede seleccionar un gen que codifica ARN polimerasa II 140 (la proteína codificada contemplada en el presente documento como ARNPII 140; y un ácido nucleico que codifica ARNPII 140 contemplado en el presente documento como "rnapII 140") como un gen

objetivo para el silenciamiento post transcripcional. En ejemplos particulares, un gen objetivo útil para la inhibición post transcripcional es el nuevo gen referido en este documento como rnapII 140. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos de rnapII 140 (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, y SEQ ID NO:81); el complemento de rnapII 140 (por ejemplo SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, y SEQ ID NO:81); y fragmentos de cualquiera de los anteriores por lo tanto, se divulga en el presente.

También se divulgan moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es al menos 85% idéntico a una secuencia del aminoácido dentro de un producto génico objetivo (por ejemplo, ARNPII 140, el producto de rnapII 140). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede componerse de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es al menos 85% idéntica a una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:80, o SEQ ID NO:82 (ARNPII 140). En ejemplos particulares, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es al menos 85% idéntica a una secuencia de aminoácidos dentro de ARNPII 140. También se divulgan moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que es el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es al menos 85% idéntico a una secuencia del

aminoácido dentro de un producto génico objetivo.

También se divulgan secuencias de ADNc de ácido nucleico que pueden utilizarse para la producción de moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNmi y ARNhp) que son complementarias a la totalidad o parte de un gen objetivo de plaga de coleópteros, por ejemplo: rnapII 140. En modalidades particulares, los ARNds, ARNsi, ARNmi y/o ARNhp se pueden producir *in vitro* o *in vivo* por un organismo modificado genéticamente, como una planta o una bacteria. En ejemplos particulares, se divulgan moléculas de ADNc que pueden utilizarse para producir moléculas de ARNi que son complementarias a la totalidad o parte de rnapII 140 (por ejemplo, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, y SEQ ID NO:81).

Además se divulgan medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleóptero, y los medios para proporcionar resistencia a las plagas de coleópteros a una planta. Ejemplos de medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros, incluyen, pero no se limitan a una molécula de hebra simple o doble de ARN que consiste de al menos una de SEQ ID NO: 3 (región rnapII 140 1; aquí referida a veces como rnapII reg1), SEQ ID NO: 4 (rnapII 140 región 2, en el presente documento referida a veces como rnapII reg2), SEQ ID NO: 5 (rnapII 140 región 3, en el presente documento referida a veces como rnapII reg3), SEQ ID NO: 77 (rnapII 140 región 1; aquí referida a veces como PB rnapII reg1), o el complemento de éstas. Los

equivalentes funcionales de medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros incluyen, pero no están limitadas a, moléculas de ARN de una sola o de doble hebra que son sustancialmente homólogas a la totalidad o parte de un gen que comprende SEQ ID NO: 1). Los equivalentes funcionales de medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros incluyen, pero no están limitados a, moléculas de ARN de una sola o de doble hebra que son sustancialmente homólogas a la totalidad o parte de un gen de PB que comprende SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, o SEQ ID NO: 81. Un medio para proporcionar resistencia a las plagas de coleópteros a una planta puede ser una molécula de ADN que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un medio para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros operativamente vinculada a un promotor, en donde la molécula de ADN es capaz de integrarse en el genoma de una planta de maíz.

Se divulgan métodos para el control de una población de una plaga de coleópteros, que comprenden proporcionar a una plaga de coleópteros una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNmi y ARNhp) que funciona al ser tomada por la plaga de coleópteros para inhibir una función biológica dentro de la plaga de coleópteros, en donde la molécula ARNi comprende todo o parte de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:81; el complemento de

SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:81; una secuencia codificadora nativa de organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende todo o parte de cualquiera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5; el complemento de una secuencia codificadora nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende todo o parte de cualquiera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5; una secuencia no codificadora nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende todo o parte de cualquiera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5; y el complemento de una secuencia no codificadora nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende todo o parte de cualquiera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5; una secuencia codificadora nativa de un organismo de *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende todo o parte de cualquiera de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:81; el complemento de una secuencia codificadora nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende todo o parte de cualquiera de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:81; una secuencia codificadora nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende todo o parte de cualquiera de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:81; y el complemento de una secuencia no codificadora

nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende todo o parte de cualquiera de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:81.

5 En ejemplos concretos, se divulgan métodos para controlar una población de una plaga de coleópteros, que comprenden proporcionar a una plaga de coleópteros una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNmi y ARNhp) que funciona al ser tomada por la plaga de coleópteros para
10 inhibir una función biológica dentro de la plaga de coleópteros, en donde la molécula de ARNi se compone de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo formado por: todo o parte de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ
15 ID NO: 81; el complemento de todo o parte de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 81; todo o parte de una secuencia de codificación nativa de un organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) compuesto por SEQ ID NO: 1, SEQ
20 ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; todo o parte del complemento de una secuencia de codificación nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; todo o parte de una secuencia de no codificación nativa de un organismo de
25 *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; y todo o parte del complemento de una

secuencia de no codificación nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; todo o parte de una secuencia de
 5 codificación nativa de un organismo de *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, y SEQ ID NO: 81; todo o parte del complemento de una secuencia de codificación nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID
 10 NO: 77, y SEQ ID NO: 81; todo o parte de una secuencia de no codificación nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, y SEQ ID NO: 81; y todo o parte del complemento de una secuencia de
 15 no codificación nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 81.

También se divulgan en este documento métodos en
 20 donde los ARNds, ARNsi, ARNmi, y/o ARNhp se pueden proporcionar a una plaga de coleópteros por ensayo de inyección, dieta, siendo rociados en las plantas, o en células de plantas genéticamente modificadas que expresan los, ARNds, ARNsi, ARNmi, y/o ARNhp. En estos y otros
 25 ejemplos, los ARNds, ARNsi, ARNmi, y/o ARNhp pueden ser ingeridos por las larvas de la plaga de coleópteros o adultos. La ingestión de los ARNds, ARNsi, ARNmi, y/o ARNhp

de la presente divulgación podría resultar entonces en ARNi en las larvas, que a su vez pueden resultar en el silenciamiento de un gen esencial para la viabilidad de la plaga de coleópteros y conduciendo finalmente a la mortalidad de las larvas y/o adultos. Por lo tanto, se describen métodos en los que las moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencia(s) de ácido nucleico ejemplares útiles para el control de plagas de coleópteros se proporcionan a una plaga de coleópteros. En particular, los ejemplos de plagas de coleópteros controladas por el uso de moléculas de ácido nucleico descritas pueden ser WCR, NCR, SCR o PB. Las anteriores características y otras serán más evidentes de la siguiente Descripción Detallada de varias modalidades, que procede con referencia a las figuras que se acompañan.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1 y 2 incluyen ilustraciones de las estrategias utilizadas para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNs.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias de ácido nucleico listadas en el listado de secuencias adjunto se muestran utilizando abreviaturas de letra estándar para bases de nucleótidos, tal como se define en 37 C.F.R. § 1.822. Sólo una hebra de cada

25

secuencia de ácido nucleico se muestra, pero la hebra complementaria y la hebra complementaria inversa se entienden como si estuvieran incluidas por cualquier referencia a la hebra mostrada. En el listado de secuencias adjunto:

5 SEQ ID NO: 1 muestra una secuencia de ADN de rnap II 140 de *Diabrotica*.

 SEQ ID NO: 2 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína de ANRP II 140 de *Diabrotica*.

10 SEQ ID NO: 3 muestra una secuencia de *Diabrotica* de rnap II 140 región 1 que se usó para la síntesis *in vitro* de ARNs (las secuencias de promotor de T7 en extremos 5' y 3' no se muestran).

15 SEQ ID NO: 4 muestra una secuencia de *Diabrotica* de rnap II 140 región 2 que se usó para la síntesis *in vitro* de ARNs (las secuencias de promotor de T7 en extremos 5' y 3' no se muestran).

20 SEQ ID NO: 5 muestra una secuencia de *Diabrotica* de rnap II 140 región 3 que se usó para la síntesis *in vitro* de ARNs (las secuencias de promotor de T7 en extremos 5' y 3' no se muestran).

 SEQ ID NO: 6 muestra una secuencia de ADN de un promotor de fago de T7.

25 SEQ ID NO: 7 muestra una secuencia de ADN de un segmento de región codificadora de YFP que se utilizó para la síntesis *in vitro* de ARNs (las secuencias de promotor de T7 en extremos 5' y 3' no se muestran).

 SEQ ID NOs. 8 a 15 muestran cebadores utilizados

para amplificar las porciones de una secuencia de rnapII 140 que comprende rnapII 140 región 1, rnapII 140 región 2 y rnapII 140 región 3 y cebadores utilizados para amplificar un segmento de región codificadora de YFP.

5 SEQ ID NO: 16 presenta una secuencia de formación v2 de ARN de horquilla de rnapII 140 como se encuentra en pDAB114524. Las mayúsculas son la hebra de sentido rnapII 140, las minúsculas subrayadas comprenden intrón de ST-LS1, las minúsculas no subrayadas son hebras antisentido de rnapII
10 140.

AAATAAGAGACTCGATTTGGCTGGACCATTATTGGCTTTCCTCTTCAGAGG
GCTTTTCAAGAACCTAATGAAAGAAGTTCGTATGTATGCCCAGAAGTTTATCGATAGAGGC
AAAGATTTCAATCTGGATCTGGCCATCAAAACCAAATAACGGACGGTCTGAGGTATT
CTCTCGCgactagtagtaccggttgggaaaggtatgtttctgcttctacctttgatatatatat
15 aataattatcactaattagtagtaatatagtagtttcaagtatTTTTTTcaaaataaaagaa
ttagtagtatatagctattgcttttctgtagtttataagtgtgtatattttaatttataactt
ttctaatatatgaccaaacatggtgatgtgcaggttgatccgcggttagcgagagaatac
ctcagaccgtccggttattagtttggttttgatggccagatccagattgaaatctttgcctc
tatcgataaacttctgggcatacatagcaacttctttcattaggttcttgaaaagccctct
20 gaagaggaaagccaataatggtccagccaaatcgagtctcttattt

SEQ ID NO: 17 presenta una secuencia de formación v2 de ARN de horquilla de rnapII 140 como se encuentra en pDAB114525. Las mayúsculas son la hebra de sentido rnapII 140, las minúsculas subrayadas comprenden intrón de ST-LS1,
25 las minúsculas no subrayadas son hebras antisentido de rnapII 140.

TTCTGCAGTAGAAAGAGGATTTTTTCAGATCTGTGTTTTACCGGTCTTATAA

21

AGACGCCGAATCCAAACGTATAGGAGACCAGGAAGAACAATTCGAAAAACCGACAAGACAG
ACGTGCCAGGGCATGAGGAATGCCCTTTACGATAAATTAGACGACGACgactagtagtaccggt
tgaggaaaggtatggttctgcttctacctttgatatatataataattatcactaattagt
agtaatatagtagtttcaagtagtttttttcaaaataaaagaatgtagtagtatagctattgct
5 tttctgtagtttataagtggtgtatattttaatttataacttttctaataatgacccaaac
atggtgatgtgcagggtgatccgcggttagtcgtcgtctaatttatcgtaaagggcattcc
tcatgccctggcacgtctgtcttgtcggtttttcgaattgttcttctggtctcctatacg
tttggaattcggcgtctttataagaccggtaaaacacagatctgaaaaatcctctttctact
gcagaa

10 SEQ ID NO: 18 presenta una secuencia v2 formadora de horquilla YFP de RNA como se encuentra en pDAB110853. Las mayúsculas son la hebra de sentido YFP, las minúsculas subrayadas comprenden intrón de ST-LS1, las minúsculas no subrayadas son hebras antisentido de YFP.

15 ATGTCATCTGGAGCACTTCTCTTTCATGGGAAGATTCCTTACGTTGTGGAG
ATGGAAGGGAATGTTGATGGCCACACCTTTAGCATACGTGGGAAGGCTACGGAGATGCCT
CAGTGGGAAAGgactagtagtaccggttgaggaaaggtatggttctgcttctacctttgatatat
atataataattatcactaattagtagtaatatagtagtttcaagtagtttttttcaaaataaa
agaatgtagtagtatagctattgcttttctgtagtttataagtggtgtatattttaatttata
20 acttttctaataatgacccaaacatggtgatgtgcagggtgatccgcggttactttccca
ctgaggcatctccgtagcctttcccacgtatgctaaaggtgtggccatcaacattcccttc
catctccacaacgtaaggaatcttcccatgaaagagaagtgctccagatgacat

SEQ ID NO: 19 muestra una secuencia de intrón de LS1-ST.

25 SEQ ID NO: 20 muestra una secuencia de ADN que codifica una proteína fluorescente amarilla (YFP) como se encuentra en el plásmido pDAB110556.

22

SEQ ID NO: 21 muestra una secuencia de ADN de región 1 de Anexina.

SEQ ID NO: 22 muestra una secuencia de ADN de región 2 de Anexina.

5 SEQ ID NO: 23 muestra una secuencia de ADN de región 1 de Beta Espectrina 2.

SEQ ID NO: 24 muestra una secuencia de ADN de región 2 de Beta Espectrina 2.

10 SEQ ID NO: 25 muestra una secuencia de ADN de región 1 de mtRP-L4.

SEQ ID NO: 26 muestra una secuencia de ADN de región 2 de mtRP-L4.

15 SEQ ID NOs: 27 a 50 muestran cebadores utilizados para amplificar regiones del gen de Anexina, Beta Espectrina 2, mtRP-L4 e YFP para la síntesis de ARNs.

SEQ ID NO: 51 muestra una secuencia de ADN de maíz que codifica una proteína tipo TIP41.

SEQ ID NO: 52 muestra una secuencia de ADN de T20NV oligonucleótido.

20 SEQ ID NOs: 53 a 57 muestran cebadores y sondas utilizadas para medir los niveles de transcripción en tejidos del maíz.

25 SEQ ID NO: 58 muestra una secuencia de ADN de una porción de una región codificadora de SpecR usada para la detección de la troncal del vector binario.

SEQ ID NO: 59 muestra una secuencia de ADN de una porción de una región codificadora de AAD1 usada para el

análisis del número de copia genómica.

SEQ ID NO: 60 muestra una secuencia de ADN de un gen invertasa de maíz.

5 SEQ ID NOs: 61- 72 muestran secuencias de cebadoras y sondas utilizadas para el análisis de números de copia genética y detección troncal del plásmido de vector primario.

SEQ ID NO: 73 muestra una secuencia de ADN que comprende RpII140 de *Meligethes aeneus*.

10 SEQ ID NO: 74 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína RpII140 de *Meligethes aeneus*.

SEQ ID NO: 75 muestra una secuencia de ADN que comprende RpII140 de *Meligethes aeneus*.

SEQ ID NO: 76 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína RpII140 de *Meligethes aeneus*.

15 SEQ ID NO: 77 muestra el RpII140 reg1 utilizado para la producción de ARNs.

SEQ ID NOs: 78 y 79 muestran cebadores utilizados para amplificar las porciones de una secuencia de RpII140 que comprende *Meligethes aeneus* RpII140 reg1.

20 SEQ ID NO: 80 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína RpII140 de *Meligethes aeneus*.

SEQ ID NO: 81 muestra una secuencia de ADN que comprende RpII140 de *Meligethes aeneus*.

25 SEQ ID NO: 82 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína RpII140 de *Meligethes aeneus*.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

I. Visión General de Diversas Modalidades

En este documento se divulgan métodos y composiciones para el control genético de infestaciones de plagas de coleópteros. También se proporcionan métodos para identificar uno o más genes esenciales para el ciclo de vida de una plaga de coleópteros para uso como un gen objetivo del control mediado por ARNi de una población de plagas de coleópteros. Los vectores de plásmido de ADN que codifican una o más moléculas de ARNds, ARNsi, ARNmi y/o ARNhp pueden estar diseñadas para suprimir uno o más genes objetivo esenciales para el crecimiento, la supervivencia, desarrollo y/o reproducción. En algunas modalidades, se proporcionan métodos para represión post transcripcional de la expresión o inhibición de un gen objetivo mediante moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una secuencia de codificación o de no codificación del gen objetivo en una plaga de coleópteros. En estas y otras modalidades, una plaga de coleópteros puede ingerir una o más moléculas de ARNds, ARNsi, ARNmi o ARNhp transcritas de todas o de una porción de una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de codificación o de no codificación de un gen objetivo, de tal modo proporcionando un efecto protector a la planta.

Por lo tanto, algunas modalidades implican la inhibición específica de secuencia de expresión de productos génicos objetivo, utilizando dsRNA, ARNsi, ARNmi y/o ARNhp

que es complementaria a las secuencias de codificación y/o de no codificación de los genes objetivo para lograr por lo menos el control parcial de una plaga de coleópteros. Se divulga un conjunto de moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas que comprende una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, como se establece en cualquiera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:81, y fragmentos de las mismas. En algunas modalidades, una molécula de ARNs estabilizada puede expresarse de esta secuencia, fragmentos de la misma o un gen que comprende una de estas secuencias, para el silenciamiento o inhibición post transcripcional de un gen objetivo. En ciertas modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de SEQ ID NO: 1. En otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de SEQ ID NO: 3. En otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de SEQ ID NO: 4. En otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de SEQ ID NO: 5. En otras modalidades más, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de SEQ ID NO: 73. En otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de SEQ ID NO: 75. En otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de SEQ ID NO: 77. En otras modalidades más, las moléculas de

ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de SEQ ID NO: 81.

Algunas modalidades implican una célula huésped recombinante (por ejemplo, una célula de la planta) que tiene en su genoma al menos una secuencia de ADN recombinante que codifica al menos una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds). En modalidades particulares, la molécula de ARNi se puede producir por la célula huésped recombinante y después ser ingerida por una plaga de coleópteros para post transcripcionalmente silenciar o inhibir la expresión de un gen objetivo en la plaga de coleópteros. La secuencia de ADN recombinante puede abarcar, por ejemplo, uno o más de cualquiera de SSEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, o SEQ ID NO:81; fragmentos de cualquiera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, o SEQ ID NO:81; o una secuencia parcial de un gen que comprende una o más de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, o SEQ ID NO:81; o sus complementos.

Las modalidades particulares implican una célula huésped recombinante que tiene en su genoma una secuencia de ADN recombinante que codifica al menos una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds) que comprende todo o parte de EQ ID NO:1, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, y/o SEQ ID NO:81. Cuando se ingiere por una plaga de coleópteros, la molécula de ARNi puede silenciar o inhibir la expresión de un gen objetivo

compuesto por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, o SEQ ID NO:81, en la plaga de coleópteros y así dar lugar al cese de crecimiento, desarrollo, reproducción y alimentación en la plaga de coleópteros.

5 En algunas modalidades, una célula huésped recombinante que tiene al menos una secuencia de ADN recombinante que codifica por lo menos una molécula de ARNi en su genoma puede ser una célula de la planta transformada. Algunas modalidades implican las plantas transgénicas que
10 comprenden tal célula de la planta transformada. Además de estas plantas transgénicas, las plantas de la progenie de cualquier generación de planta transgénica, semillas transgénicas y productos vegetales transgénicos, son siempre provistas, cada una de los cuales se compone de secuencias de
15 ADN recombinante. En modalidades particulares, una molécula de ARNi puede expresarse en una célula de planta transgénica. Por lo tanto, en estas y otras modalidades, una molécula de ARNi puede ser aislada de una célula de la planta transgénica. En modalidades particulares, la planta
20 transgénica es una planta seleccionada del grupo que comprende maíz (*Zea mays*), soya (*Glycine max*), canola (*Brassica spp.*) y plantas de la familia *Poaceae*.

 Algunas modalidades implican un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de plaga de
25 coleópteros. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico puede ser proporcionada, en donde la molécula de ácido nucleico se compone de una secuencia de nucleótidos

que codifican una molécula de ARNi. En modalidades particulares, una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARNi podría relacionarse operativamente a un promotor y también puede estar operativamente vinculada con una secuencia de terminación de transcripción. En modalidades particulares, un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de plaga de coleópteros puede abarcar: (a) transformar una célula de la planta con un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARNi; (b) cultivar la célula de la planta transformada en condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo de célula de planta que comprende una pluralidad de células de plantas transformadas; (c) seleccionar una célula de planta transformada que tiene integrado el vector en su genoma; y (d) determinar que la célula de planta transformada seleccionada comprende la molécula de ARNi codificada por la secuencia de nucleótidos del vector. Una planta puede ser regenerada a partir de una célula de la planta que tiene integrado en su genoma del vector y comprende la molécula de ARNi codificada por la secuencia de nucleótidos del vector.

Por lo tanto, también se divulga una planta transgénica que comprende un vector con una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARNi integrada en su genoma, en donde la planta transgénica comprende la molécula de ARNi codificada por la secuencia de nucleótidos del vector. En modalidades particulares, la expresión de una

molécula de ARNi en la planta es suficiente para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de una plaga de coleópteros que entra en contacto con la planta transformada o la célula de la planta, por ejemplo, al alimentarse de la planta transformada, una parte de la planta (por ejemplo, raíz) o célula de la planta. Las plantas transgénicas divulgadas en este documento pueden mostrar resistencia o tolerancia mejorada a plagas de coleópteros. Las plantas transgénicas particulares pueden mostrar resistencia y/o tolerancia mejorada a una o más plagas de coleópteros seleccionadas del grupo que consiste de: WCR; NCR; SCR; MCR; *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; y *Meligethes aeneus* Fabricius.

También se divulgan en este documento métodos para la administración de agentes de control, tales como una molécula de ARNi, a una plaga de coleópteros. Dichos agentes de control pueden causar, directa o indirectamente, un deterioro en la capacidad de la plaga de coleópteros para alimentarse, crecer o de lo contrario dañar a un huésped. En algunas modalidades, se proporciona un método que comprende la administración de una molécula de ARNi estabilizado a una plaga de coleópteros para suprimir al menos un gen objetivo en la plaga de coleópteros, reduciendo o eliminando así los daños a las plantas por una plaga de coleópteros. En algunas modalidades, un método para inhibir la expresión de un gen objetivo en una plaga de coleópteros puede resultar en el cese del hábito de crecimiento, desarrollo, reproducción y

alimentación en la plaga de coleópteros. En algunas modalidades, el método puede eventualmente resultar en la muerte de la plaga de coleópteros.

En algunas modalidades, se proporcionan composiciones (por ejemplo, una composición tópica) que comprenden una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNs) para el uso en plantas, animales y/o el medio ambiente de una planta o un animal para lograr la eliminación o reducción de una infestación de plagas de coleópteros. En modalidades particulares, la composición puede ser una fuente de composición nutricional o de alimentos para alimentar a la plaga de coleópteros. Algunas modalidades comprenden poner la composición de fuente nutricional o de alimentos a disposición de la plaga de coleópteros. La ingestión de una composición que comprende moléculas de ARNi puede resultar en la absorción de las moléculas por una o más células de la plaga de coleópteros, que puede a su vez resultar en la inhibición de la expresión de al menos un gen objetivo en células de la plaga de coleópteros. La ingestión de o el daño a una planta o célula de la planta por una plaga de coleópteros puede ser limitada o eliminada en o sobre cualquier tejido huésped o entorno en el que está presente la plaga de coleópteros proporcionando una o varias composiciones que comprenden una molécula de ARNi en el huésped de la plaga de coleópteros.

Las composiciones y métodos aquí divulgados pueden utilizarse juntos en combinaciones con otras composiciones y

métodos para el control de daños por plagas de coleópteros. Por ejemplo, una molécula de ARNi como se describe en este documento para proteger las plantas contra plagas de coleópteros podrá ser utilizada en un método que comprende el uso adicional de uno o más agentes químicos eficaces contra una plaga de coleópteros, bioplaguicidas eficaces contra una plaga de coleópteros, la rotación de cultivos o técnicas genéticas recombinantes que presentan características diferentes de las características de los métodos mediados por ARNi y las composiciones de ARNi (por ejemplo, la producción recombinante de proteínas en las plantas que son perjudiciales para una plaga de coleópteros (por ejemplo, toxinas Bt)).

15 **II. Abreviaturas**

ARNds ácido ribonucleico de doble hebra

GI Inhibición del crecimiento

NCBI Centro Nacional de Información biotecnológica

ADNg ADN genómico

20 ARNi Ácido ribonucleico inhibidor

ORF Marco de lectura abierta

ARNi Interferencia del ácido ribonucleico

ARNmi Micro ácido ribonucleico inhibidor

ARNsi ácido ribonucleico inhibidor corto

25 ARNhp ácido ribonucleico con horquilla

UTR Región sin traducir

WCR crisomela del maíz del oeste (*Diabrotica*

virgifera virgifera LeConte)

NCR crisomela del maíz del norte (*Diabrotica barberi* Smith y Lawrence)

5 MCR crisomela del maíz mexicana (*Diabrotica virgifera zea* Krysan y Smith)

PCR Reacción en cadena de polimerasa

RISC Complejo silenciador inducido por ARN

SCR Crisomela de maíz del sur (*Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber)

10 PB Escarabajo del polen (*Meligethes aeneus* Fabricius)

III. Términos

15 En la descripción y las tablas que siguen, se utilizan una serie de términos. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de la descripción y reivindicaciones, incluyendo el ámbito para que dichos términos se den, se proporcionan las siguientes definiciones:

20 Plaga de Coleópteros: En ejemplos particulares, una plaga de coleópteros es seleccionada de la lista que comprende *D. v. virgifera* LeConte (WCR); *D. Barberi* Smith y Lawrence (NCR); *D. u. howardi* (SCR); *D. v. zea* (MCR); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; y *Meligethes aeneus* Fabricius.

25 Contacto (con un organismo): Como se utiliza aquí, el término "contacto con" o "absorción por" un organismo (por ejemplo, una plaga de coleópteros), con respecto a una

molécula de ácido nucleico, incluye la internalización de la molécula de ácido nucleico en el organismo, por ejemplo y sin limitación: ingestión de la molécula por el organismo (por ejemplo, por alimentación); contactar al organismo con una
5 composición que comprende la molécula de ácido nucleico; y empapar a los organismos con una solución que comprende la molécula de ácido nucleico.

Cóntigo: Como se utiliza en este documento, el término "cóntigo" se refiere a una secuencia de ADN que es
10 reconstruida a partir de un conjunto de segmentos de ADN que se superponen derivados de una sola fuente genética.

Planta de maíz: Como se utiliza en este documento, el término "planta de maíz" se refiere a una planta de la especie *Zea mays* (maíz).

15 ARNi de codificación: Como se utiliza en este documento, el término "ARNi de codificación" incluye un gen cuyo producto de la transcripción del ARN es capaz de formar una estructura de ARNs intramolecular (por ejemplo, una horquilla) o una estructura de ARNs intermolecular (por
20 ejemplo, por hibridación a una molécula de ARN objetivo).

Expresión: Como se utiliza en este documento, "expresión" de una secuencia de codificación (por ejemplo, un gen o un transgen) se refiere al proceso por el cual la información codificada de una unidad transcripcional de
25 ácidos nucleicos (incluyendo, por ejemplo, ADN genómico o ADNc) se convierte en una parte de una célula, a menudo incluyendo la síntesis de una proteína estructural,

operacional o no operacional. La expresión génica puede ser influenciada por señales externas; por ejemplo, la exposición de un célula, tejido u organismo a un agente que aumenta o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen puede ser regulada en cualquier lugar en el camino del ADN al ARN a la proteína. La regulación de la expresión génica ocurre, por ejemplo, a través de controles que actúan sobre la transcripción, traducción, transporte y procesamiento del ARN, la degradación de las moléculas intermediarias como ARNm, o a través de la activación, inactivación, compartimentación o degradación de las moléculas de proteína específica después de que se han hecho, o por combinaciones de las mismas. La expresión génica puede medirse en el nivel del ARN o el nivel de proteína por cualquier método conocido en la técnica incluyendo, sin limitación, northern blot (RNAA), RT PCR, western (inmuno) blot, o ensayo(s) de actividad de proteína *in vitro*, *in situ* o *in vivo*.

Material genético: Como se utiliza en este documento, el término "material genético" incluye todos los genes y moléculas de ácido nucleico, como ADN y ARN.

Inhibición: Como se utiliza en este documento, el término "inhibición", cuando se utiliza para describir un efecto sobre una secuencia de codificación (por ejemplo, un gen), se refiere a una disminución apreciable en el nivel celular de ARNm transcrito de la secuencia de codificación y/o péptido, polipéptido o producto de proteína de la secuencia de codificación. En algunos ejemplos, la expresión

de una secuencia de codificación puede ser inhibida de tal manera que la expresión sea casi eliminada. "Inhibición específica" se refiere a la inhibición de la secuencia de codificación objetivo sin afectar consecuentemente la expresión de otras secuencias de codificación (por ejemplo, genes) en la célula en donde se está llevando a cabo la inhibición.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o proteína) ha sido sustancialmente separado, producido aparte de o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en la que el componente ocurre naturalmente (es decir, otros ADN y ARN cromosómico y extra cromosómico, y proteínas). Las moléculas de ácido nucleico y proteínas que han sido "aisladas" incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas por métodos de purificación estándar. El término también abarca los ácidos nucleicos y las proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula huésped, así como moléculas de ácido nucleico químicamente sintetizadas, proteínas y péptidos.

Molécula de ácido nucleico: Como se utiliza en este documento, el término "molécula de ácido nucleico" puede referirse a una forma polimérica de nucleótidos, que pueden incluir hebras sentido y anti sentido hebras de ARN, ADNc, ADN genómico y formas sintéticas y polímeros mixtos de los anteriores. Un nucleótido puede referirse a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o una forma modificada

de cualquier tipo de nucleótido. Una "molécula de ácido nucleico", como se usa en este documento, es sinónimo de "ácido nucleico" y "polinucleótido." Una molécula de ácido nucleico es generalmente de por lo menos 10 bases de longitud, a menos que se especifique lo contrario. Por convención, la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico se lee desde el extremo 5' al extremo 3' de la molécula. El "complemento" de una secuencia de nucleótidos se refiere a la secuencia, de 5' a 3', de las nucleobases que forman pares de bases con las nucleobases de la secuencia de nucleótidos (es decir, A-T/U y G-C). El "complemento inverso" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a la secuencia, de 3' a 5', de las nucleobases que forman pares de bases con las nucleobases de la secuencia de nucleótidos.

"Moléculas de ácido nucleico" incluyen formas de hebra sencilla y doble de ADN; formas de hebra sencilla de ARN; y formas de hebra doble de ARN (ARNds). El término "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a las hebras sentido y antisentido de un ácido nucleico como hebras sencillas individuales o dúplex. El término "ácido ribonucleico" (ARN) es inclusivo de ARNi (ARN inhibidor), ARNds (ARN doble hebra), ARNsi (ARN interferente corto), ARNm (ARN mensajero), ARNmi (microARN), ARNhp (ARN de horquilla), ARNt (ARN de transferencia, cargado o descargado con un aminoácido acilado correspondiente) y ARNc (ARN complementario). ARNi, como se utiliza en este documento, se refiere a moléculas de ARN que son capaces de inhibir la

expresión de un gen o genes objetivo e incluyen, pero no se limitan a, ARNds, ARNsi, ARNmi, ARNhp y ARN antisentido. El término "ácido desoxirribonucleico" (ADN) es inclusivo de ADNc, ADN genómico e híbridos de ADN-ARN. Los términos "segmento del ácido nucleico" y "segmento de secuencia de nucleótidos" o más generalmente "segmento", se entenderá por aquellos en la técnica como un término funcional que incluye las secuencias genómicas, secuencias de ARN ribosómico, secuencias de ARN de transferencia, secuencias de ARN mensajero, secuencias operón y pequeñas secuencias de nucleótidos diseñadas que codifican o pueden ser adaptadas para codificar péptidos, polipéptidos o proteínas.

Oligonucleótido: Un oligonucleótido es un polímero de ácido nucleico corto. Los oligonucleótidos pueden formarse por escisión de segmentos de ácido nucleico más largos, o polimerizando los precursores de nucleótidos individuales. Los sintetizadores automatizados permiten la síntesis de oligonucleótidos hasta varios cientos de bases de longitud. Debido a que los oligonucleótidos pueden unirse a una secuencia de nucleótidos complementaria, se puede utilizar como sondas para la detección de ADN o ARN. Los oligonucleótidos compuestos de ADN (oligodesoxirribonucleótidos) pueden utilizarse en PCR, una técnica para la amplificación de secuencias de ADN y del ARN (transcripción inversa para producir un ADNc). En PCR, el oligonucleótido se conoce normalmente como un "cebador", que permite que una polimerasa de ADN extienda el oligonucleótido

y replique la hebra complementaria.

Una molécula de ácido nucleico puede incluir uno o ambos nucleótidos de origen natural y modificados enlazados juntos vínculos del nucleótido de ocurrencia natural y/o no natural. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser modificadas químicamente o bioquímicamente, o pueden contener bases nucleótidas naturales o derivatizadas, como será apreciado fácilmente por los de habilidad en la técnica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos de ocurrencia natural con un análogo, modificaciones internucleótidas (por ejemplo, vínculos sin carga: por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc..; vínculos cargados: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc..; fracciones pendientes: por ejemplo, péptidos; intercaladores: por ejemplo, acridina, psoralen, etc..; quelantes; alquilantes; y vínculos modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.). El término "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier conformación topológica, incluyendo conformaciones de hebra sencilla, hebra doble, parcialmente duplicadas, triplexadas, horquilladas, circulares y con candado.

Como se utiliza en el presente, con respecto al ADN, el término "secuencia de codificación," "secuencia estructural de nucleótidos", o "molécula estructural de ácido nucleico" se refiere a una secuencia de nucleótidos, cuando

está bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas, que se transcribe para producir ARN (por ejemplo, ARNm o un ARNi) y, en el caso de ARNm se traduce en última instancia en un polipéptido. Con respecto al ARN, el término "secuencia de codificación" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se traduce en un péptido, polipéptido o proteína. Los límites de una secuencia de codificación son determinados por un codón de inicio de traducción en el terminal 5' y un codón de detención de traducción en el terminal 3'. Las secuencias de codificación incluyen, pero no se limitan a: ADN genómico; ADNc; EST; y secuencias de nucleótidos recombinantes.

Genoma: Como se utiliza en este documento, el término "genoma" se refiere al ADN cromosómico encontrado dentro del núcleo de una célula y también se refiere a ADN de organelas encontrado dentro de los componentes subcelulares de la célula. En algunas modalidades, una molécula de ADN puede introducirse en una célula de planta de tal manera que la molécula de ADN se integra en el genoma de la célula de la planta. En estas y otras modalidades, la molécula de ADN puede o bien integrarse en el ADN nuclear de la célula de la planta, o integrado en el ADN del cloroplasto o mitocondria de la célula de la planta. El término "genoma" como se aplica a las bacterias se refiere al cromosoma y plásmidos dentro de la célula bacteriana. En algunas modalidades, una molécula de ADN puede introducirse en una bacteria de tal manera que la molécula de ADN se integra en el genoma de la bacteria. En estas y otras modalidades, la molécula de ADN

puede ser cromosómicamente integrada o localizada o en un plásmido estable.

Identidad de secuencia: El término "identidad de secuencia" o "identidad" como se utiliza en este documento, en el contexto de dos ácidos nucleicos o secuencias de polipéptido, se refiere a los residuos en las dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para la máxima correspondencia sobre una ventana de comparación específica.

Como se utiliza en este documento, el término "porcentaje de identidad de secuencia" puede referirse al valor determinado mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico o secuencias de polipéptido) sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede abarcar adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones compensadas en donde se da el residuo de nucleótido o aminoácido idéntico en ambas secuencias para arrojar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Una secuencia que es idéntica en cada posición en comparación con una secuencia de referencia se dice que es 100% idéntica a la

secuencia de referencia y viceversa.

Los métodos para alinear las secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Varios programas y algoritmos de alineación se describen en, por ejemplo: Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 85:2444; Higgins y Sharp (1988) *Gene* 73:237 244; Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5:151 153; Corpet et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881 10890; Huang et al. (1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-165; Pearson et al. (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331; Tatiana et al. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-250. Un examen detallado de los métodos de alineación de secuencia y cálculos de homología puede encontrarse en, por ejemplo, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

La Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (BLAST™; Altschul et al. (1990)) está disponible en varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional de Información biotecnológica (Bethesda, MD) y en Internet, para su uso en relación con varios programas de análisis de secuencia. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia utilizando este programa está disponible en Internet en la sección "ayuda" para BLAST. Para las comparaciones de secuencias de ácido nucleico, se puede emplear la función "secuencias Blast 2" del programa BLAST (Blastn) utilizando la matriz de BLOSUM62 por defecto a los parámetros

predeterminados. Las secuencias de ácido nucleico con aún mayor semejanza con las secuencias de referencia mostrarán creciente porcentaje de identidad cuando se evalúen mediante este método.

5 Específicamente hibridable/Específicamente
complementaria: Como se utiliza en este documento, los
términos "Específicamente hibridable" y "Específicamente
complementaria" son términos que indican un grado suficiente
de complementariedad tal que el enlace estable y específico
10 se produce entre la molécula de ácido nucleico y una molécula
de ácido nucleico objetivo. La hibridación entre dos
moléculas de ácido nucleico consiste en la formación de una
alineación anti paralela entre las secuencias de ácido
nucleico de las dos moléculas de ácido nucleico. Las dos
15 moléculas son entonces capaces de formar enlaces de hidrógeno
con las bases correspondientes en la hebra opuesta para
formar una molécula de dúplex que, si es lo suficientemente
estable, es detectable mediante métodos conocidos en la
técnica. Una molécula de ácido nucleico no necesita ser 100%
20 complementaria a la secuencia objetivo para ser
específicamente hibridable. Sin embargo, la cantidad de
complementariedad de la secuencia que debe existir para que
la hibridación sea específico es una función de las
condiciones de hibridación utilizadas.

25 Las condiciones de hibridación, resultantes en
particulares grados de exigencia, variará dependiendo de la
naturaleza del método de hibridación de elección y la

composición y la longitud de las secuencias de ácido nucleico hibridantes. En general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{++}) de la hibridación determinará el rigor de la hibridación. La fuerza iónica de la solución de lavado y la temperatura de lavado también influyen en la exigencia. Los cálculos sobre las condiciones de hibridación requeridas para alcanzar grados particulares de exigencia son conocidos por las personas de conocimientos ordinarios en la técnica y se comentan, por ejemplo, en Sambrook et al. (ed.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a. ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, capítulos 9 y 11, y actualizaciones; y Hames y Higgins (eds.) Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, 1985. Instrucciones y orientación más detalladas con respecto a la hibridación de ácidos nucleicos pueden encontrarse, por ejemplo, en Tijssen, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," en Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with Nucleic Acid Probes, parte I, capítulo 2, Elsevier, Nueva York, 1993; Ausubel et al., Eds., Current Protocols in Molecular Biology, capítulo 2, Greene Publishing and Wiley Interscience, NY, 1995, y actualizaciones.

Como se utiliza en este documento, "condiciones estrictas" abarca las condiciones bajo las cuales se producirá la hibridación sólo si hay más de 80% de secuencia coincidente entre la molécula de hibridación y una secuencia

homóloga dentro de la molécula de ácido nucleico objetivo. "Condiciones estrictas" incluye niveles más particulares de exigencia. Por lo tanto, como se utiliza en este documento, condiciones de "exigencia moderada" son aquellas bajo las
5 cuales las moléculas con más del 80% de secuencia coinciden (tienen menos de 20% desajuste) hibridarán; las condiciones de "alta exigencia" son aquellas bajo las cuales las secuencias con más del 90% (tienen menos de 10% de desajuste) hibridarán; y las condiciones de "exigencia muy alta" son
10 aquellas bajo las cuales las secuencias con más del 95% de coincidencia (tienen menos de 5% de desajuste) hibridarán.

Los siguientes son condiciones de hibridación no limitantes, representativas:

Condición de alta exigencia (detecta secuencias que
15 comparten al menos el 90% de identidad de secuencia):
Hibridación en tampón 5x SSC a 65°C durante 16 horas; lavar dos veces en tampón 2x SSC a temperatura ambiente durante 15 minutos cada una; y lavar dos veces en tampón 0.5x SSC a 65°C por 20 minutos cada una.

20 Condición de exigencia moderada (detecta secuencias que comparten al menos el 80% de identidad de secuencia):
Hibridación en tampón 5x a 6X SSC a 65-70°C durante 16-20 horas; lavar dos veces en tampón 2x SSC a temperatura ambiente durante 5-20 minutos cada una; y lavar dos veces en
25 tampón 1x SSC a 55-70°C por 30 minutos cada una.

Condición de control no exigente (las secuencias que compartan al menos el 50% de la identidad de secuencia

hibridarán): Hibridación en tampón 6x SSC a temperatura de 55°C durante 16-20 horas; lavar por lo menos dos veces en tampón 2x a 3x SSC a temperatura ambiente de 55°C por 20-30 minutos cada uno.

5 En este documento, el término "sustancialmente homólogo" u "homología sustancial," con respecto a una secuencia de ácido nucleico contigua, se refiere a las secuencias de nucleótidos contiguas que son sufragadas por moléculas de ácido nucleico que hibridan bajo condiciones
10 estrictas a una molécula de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico de referencia. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico con secuencias sustancialmente homólogas a una secuencia de ácido nucleico de referencia SEQ ID NO: 1 son aquellas moléculas de ácido nucleico que hibridan bajo
15 condiciones exigentes (por ejemplo, las condiciones de exigencia moderada establecidas, supra) a moléculas de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico de referencia SEQ ID NO: 1. Las secuencias sustancialmente homólogas pueden tener al menos el 80% de la identidad de la secuencia. Por
20 ejemplo, las secuencias sustancialmente homólogas pueden tener de alrededor del 80% a 100% de identidad de secuencia, tal como aproximadamente 81%; aproximadamente 82%; aproximadamente 83%; aproximadamente 84%; aproximadamente 85%; aproximadamente 86%; aproximadamente 87%;
25 aproximadamente 88%; aproximadamente 89%; aproximadamente 90%; aproximadamente 91%; aproximadamente 92%; aproximadamente 93%; aproximadamente 94% aproximadamente 95%;

aproximadamente 96%; aproximadamente 97%; aproximadamente 98%; aproximadamente 98.5%; aproximadamente 99%; aproximadamente 99.5%; aproximadamente 100%, 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 5 95%; 96%; 97%; 98%; 99; o 100%. La propiedad de homología substancial está estrechamente relacionada con la hibridación específica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico es específicamente hibridable cuando hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del 10 ácido nucleico a secuencias no objetivo en condiciones donde se desea unión específica, por ejemplo, bajo condiciones de hibridación exigentes.

Como se utiliza en este documento, el término "ortólogo" se refiere a un gen en dos o más especies que ha 15 evolucionado desde una secuencia de nucleótidos ancestral común y puede conservar la misma función en las dos o más especies.

Como se utiliza en este documento, se dice que dos moléculas de secuencia de ácido nucleico muestran 20 "complementariedad completa" cuando todos los nucleótidos de una secuencia leídos en la dirección de 5' a 3' son complementarios a cada nucleótido de la otra secuencia cuando se lee en la dirección de 3' a 5'. Una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de 25 nucleótidos de referencia mostrará una secuencia idéntica a la secuencia inversa de complemento de la secuencia de nucleótidos de referencia. Estos términos y descripciones

están bien definidos en la técnica y son fácilmente entendidos por aquellos expertos en la técnica.

Operativamente vinculados: Una primera secuencia de nucleótido está operativamente vinculada con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se encuentra en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Cuando se producen por vía recombinante, las secuencias de ácido nucleico operativamente vinculadas son generalmente contiguas y, en caso necesario, dos regiones de codificación de proteína pueden unirse en el mismo marco de lectura (por ejemplo, en una ORF traslacionalmente fundida). Sin embargo, los ácidos nucleicos no necesitan ser contiguos para vincularse operativamente.

El término, "operativamente vinculado", cuando se utiliza en referencia a una secuencia de reglamentación y una secuencia de codificación, significa que la secuencia reglamentaria afecta a la expresión de la secuencia de codificación vinculada. "Secuencias reguladoras", o "elementos de control," se refiere a las secuencias de nucleótidos que influyen en el momento y nivel/cantidad de transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o la traducción de la secuencia de codificación asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores; secuencias de traducción líder; intrones; potenciadores; estructuras de bucle de tallo; secuencias vinculantes represoras; secuencias de terminación; secuencias de reconocimiento de

poliadenilación; etc. Las secuencias reguladoras particulares pueden estar situadas hacia arriba y/o hacia abajo de una secuencia de codificación operativamente vinculada a las mismas. Además, las secuencias reguladoras particulares operativamente vinculadas a la secuencia de codificación pueden encontrarse en la hebra complementaria asociada de una molécula de doble hebra de ácido nucleico.

Promotor: Como se utiliza en este documento, el término "promotor" se refiere a una región del ADN que puede ser ascendente desde el inicio de la transcripción, y que puede estar involucrado en el reconocimiento y unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un promotor puede estar operativamente vinculado con una secuencia de codificación para la expresión en una célula o un promotor puede estar operativamente vinculado con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de señales que puede ser operativamente vinculada a la secuencia de codificación para la expresión en una célula. Un "promotor de planta" puede ser un promotor capaz de iniciar la transcripción en las células de la planta. Ejemplos de promotores bajo desarrollo controlado promotores que inician preferentemente la transcripción en ciertos tejidos, tales como hojas, raíces, semillas, fibras, vasos del xilema, traqueidas o esclerénquima. Tales promotores se denominan de "tejido preferido." Los promotores que inician la transcripción solamente en ciertos tejidos son referidos como "tejido específico." Un promotor "tipo celular

específico" principalmente activa la expresión en ciertos tipos de células en uno o más órganos, por ejemplo, las células vasculares en las raíces o las hojas. Un promotor "inducible" puede ser un promotor que puede estar bajo el control del medio ambiente. Ejemplos de condiciones ambientales que pueden iniciar la transcripción de promotores inducibles incluyen condiciones anaeróbicas y la presencia de luz. Los promotores de tejido específico, tejido preferido, tipo celular específico e inducibles constituyen la clase de los promotores "no constitutivos". Un promotor "constitutivo" es un promotor que puede ser activo en la mayoría de condiciones ambientales o en muchos tipos de tejido o célula.

Puede utilizarse cualquier promotor inducible en algunas modalidades. Ver Ward et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:361-366. Con un promotor inducible, aumenta la tasa de transcripción en respuesta a un agente inductor. Los promotores inducibles ejemplares incluyen, pero no se limitan a: Promotores del sistema ACEI que responden a cobre; genes *In2* del maíz que responden a fitoprotectores de herbicida de bencenosulfonamida; Represor Tet de Tn10; y el promotor inducible de un gen de la hormona esteroide, la actividad transcripcional de los cuales puede ser inducida por una hormona con glucocorticosteroides (Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 88:10421 10425).

Los promotores constitutivos ejemplares incluyen, pero no se limitan a: Promotores de virus de plantas, como el

promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor (CaMV);
promotores de genes de la actinia de arroz; promotores de
ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 maíz; y el
promotor de ALS, *Xba1/NcoI* fragmento 5' del gen estructural
5 *Brassica napus* ALS3 (o una secuencia de nucleótidos similar a
dicho fragmento *Xba1/NcoI*) (Patente estadounidense No.
5,659,026).

Además, puede utilizarse cualquier promotor de
tejido específico o tejido preferido tejido en algunas
10 modalidades. Las plantas transformadas con una molécula de
ácido nucleico que comprenden una secuencia de codificación
operativamente vinculada a un promotor específico del tejido
pueden producir el producto de la secuencia de codificación
exclusiva o preferencial, en un tejido específico. Los
15 promotores de tejido específico o de tejido preferido
ejemplares incluyen, pero no se limitan a: Un promotor
preferido de semilla, tal como la del gen faseolina; un
promotor inducido de hoja específica y luz tal como de cabina
o rubisco; un promotor específico de antera como el de LAT52;
20 un promotor específico de polen como el de Zm13; y un
promotor prefrito de microsporas como el de apg.

Transformación: Como se utiliza en este documento,
el término "transformación" o "transducción" se refiere a la
transferencia de una o más molécula(s) de ácido nucleico a
25 una célula. Una célula se "transforma" por una molécula de
ácido nucleico que hizo transducción dentro de la célula
cuando la molécula de ácido nucleico se convierte en

establemente replicada por la célula, ya sea por la incorporación de la molécula de ácido nucleico en el genoma celular, o la replicación episomal. Como se utiliza en este documento, el término "transformación" abarca todas las técnicas por las cuales una molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula como tal. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a: transfección con vectores virales; transformación con vectores plásmidos; electroporación (Fromm et al. (1986) *Nature* 319:791-793; *Lipofection* (Felgner et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 84:7413-7417); *microinjection* (Mueller et al. (1978) *Cell* 15:579 585); *Agrobacterium mediated transfer* (Fraley et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 80:4803-4807); *direct DNA uptake*; and *microprojectile bombardment* (Klein et al. (1987) *Nature* 327:70).

Transgen: Una secuencia de ácido nucleico exógena. En algunos ejemplos, un transgen puede ser una secuencia que codifica una o dos hebra(s) de una molécula de ARNi que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una molécula de ácido nucleico en una plaga de coleópteros. En otros ejemplos, un transgen puede ser una secuencia de ácido nucleico antisentido, en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico antisentido inhibe la expresión de una secuencia de ácido nucleico objetivo. En aún más ejemplos, un transgen puede ser una secuencia del gen (por ejemplo, un gen de resistencia a herbicidas), un gen que codifica un compuesto industrial o farmacéuticamente útil, o un gen que

codifica un rasgo agrícola deseable. En estos y otros ejemplos, un transgen puede contener secuencias reguladoras operativamente vinculadas a la secuencia de codificación del transgén (por ejemplo, un promotor).

5 Vector: Una molécula de ácido nucleico como se introduce en una celda, por ejemplo, para producir una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que permiten replicarse en la célula huésped, tal como un origen de replicación. Ejemplos de vectores
10 incluyen, pero no se limitan a: un plásmido; cósmido; bacteriófago; o virus que lleva el ADN exógeno a una célula. Un vector también puede ser una molécula de ARN. Un vector también puede incluir uno o más genes, secuencias antisentidas, y/o genes marcadores seleccionables y otros
15 elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, causando así que la célula exprese las moléculas de ácido nucleico y/o las proteínas codificadas por el vector. Un vector incluye opcionalmente materiales para ayudar a lograr la entrada de
20 la molécula de ácido nucleico a la célula (por ejemplo, un liposoma, capa de proteína, etc.).

 Rendimiento: Un rendimiento estabilizado de cerca del 100% o más en relación a la producción de variedades de revisión en el mismo lugar de crecimiento creciendo al mismo
25 tiempo y bajo las mismas condiciones. En modalidades particulares, "rendimiento mejorado" o "mejora de rendimiento" significa un cultivo que tiene un rendimiento

estabilizado de 105 a 115% o mayor en relación con el rendimiento de las variedades revisadas en el mismo lugar que contiene importantes densidades de plagas de coleópteros que son perjudiciales para ese cultivo que crece al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones.

A menos que esté específicamente indicado o implícito, los términos "un," "uno", "una", "el" y "la" significan "por lo menos uno," según lo utilizado en este documento.

A menos que se defina lo contrario en la presente, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenecen las enseñanzas de esta invención. Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en, por ejemplo, Lewin's Genes X, Jones & Bartlett Publishers, 2009 (ISBN 10 0763766321); Krebs et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0 632 02182 9); y Meyers R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1 56081 569 8). Todos los porcentajes son de peso y todas las proporciones de la mezcla de solvente son por volumen a menos que se indique lo contrario. Todas las temperaturas son en grados Celsius.

IV. Moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de plagas de coleópteros

A. Información General

En este documento se describen moléculas de ácido nucleico útiles para el control de plagas de coleópteros.

5 Las moléculas de ácido nucleico descritas incluyen secuencias objetivo (por ejemplo, genes nativos y secuencias de no codificación), ARNds, ARNsi, ARNhp y ARNmi. Por ejemplo, las moléculas de ARNds, ARNsi, ARNmi o ARNhp que se describen en algunas modalidades pueden ser específicamente

10 complementarias a la totalidad o parte de una o más secuencias de ácido nucleico nativo en una plaga de coleópteros. En estas y otras modalidades, la(s) secuencia(s) de ácido nucleico nativa(s) puede(n) ser uno o más gen(es) objetivo, cuyos productos pueden ser, por ejemplo

15 y sin limitación: implicados en un proceso metabólico; implicados en un proceso reproductivo; o implicados en el desarrollo larval. Las moléculas de ácido nucleico descritas, cuando se introducen en una célula que abarca por lo menos una secuencia de ácido nucleico nativa a la que las

20 moléculas de ácido nucleico son complementarias, específicamente, puede iniciar el ARNi en la célula y por consiguiente reducir o eliminar la expresión de la(s) secuencia(s) de ácido nucleico nativa(s). En algunos ejemplos, la reducción o eliminación de la expresión de un

25 gen objetivo por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia complementaria específicamente correspondiente puede ser letal en plagas de coleópteros o resultar en en la

reducción del crecimiento y/o reproducción.

En algunas modalidades, al menos un gen objetivo en una plaga de coleópteros puede ser seleccionado, en donde el gen objetivo comprende una secuencia de nucleótidos que comprende rnapII 140 (es decir SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, o SEQ ID NO:81). En ejemplos particulares, un gen objetivo en una plaga de coleópteros se selecciona, en donde el gen objetivo comprende una secuencia de nucleótidos novedosa que comprende rnapII 140 (es decir SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, o SEQ ID NO:81).

En algunas modalidades, un gen objetivo puede ser una molécula de ácido nucleico formada por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos 85% idéntica (por ejemplo, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, aproximadamente 100%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica) a la secuencia de aminoácidos de ARNPII 140 (es decir, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:80, o SEQ ID NO:82). Un gen objetivo puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico en una plaga de coleópteros, la inhibición post transcripcional de los cuales tiene un efecto perjudicial sobre la plaga de coleópteros, o proporciona un beneficio protector contra la plaga de coleópteros a una planta. En ejemplos particulares, un gen objetivo es una molécula de ácido nucleico formada por

una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos 85% idéntica, aproximadamente 90% idéntica, aproximadamente 95% idéntica, aproximadamente 96% idéntica, aproximadamente 97% idéntica, aproximadamente 98% idéntica, aproximadamente 99% idéntica, aproximadamente 100% idéntica, 85% idéntica, 86% idéntica, 87% idéntica, 88% idéntica, 89% idéntica, 90% idéntica, 91% idéntica, 92% idéntica, 93% idéntica, 94% idéntica, 95% idéntica, 96% idéntica, 97% idéntica, 98% idéntica, 99% idéntica, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:80, o SEQ ID NO:82.

En este documento se proporcionan secuencias de nucleótidos, la expresión que da como resultado una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que es específicamente complementaria a la totalidad o parte de una molécula de ARN nativa que está codificada por una secuencia de codificación en una plaga de coleópteros. En algunas modalidades, después de la ingestión de la molécula de ARN expresada por una plaga de coleópteros, la regulación a la baja de la secuencia de codificación en las células de la plaga de coleópteros puede obtenerse. En modalidades particulares, la regulación a la baja de la secuencia de codificación en las células de la plaga de coleópteros puede resultar en un efecto perjudicial sobre el crecimiento, viabilidad, proliferación o reproducción de la plaga de coleópteros.

En algunas modalidades, las secuencias objetivo incluyen secuencias transcritas de ARN de no codificación, tales como 5'UTRs; 3'UTRs; secuencias líder empalmadas; secuencias del intrón; secuencias de exón (por ejemplo, ARN de 5'UTR posteriormente modificado en empalme trans); las secuencias de donatón (por ejemplo, ARN no codificante requerido para proporcionar secuencias donantes para empalme trans); y otro ARN transcrito no codificante de genes objetivo de plagas de coleópteros. Estas secuencias pueden derivarse de ambos genes mono cistronicos y poli cistronicos.

Así, también se describen en este documento en relación con algunas modalidades las moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNmi y ARNhp) que comprenden al menos una secuencia de nucleótidos específicamente complementaria a la totalidad o parte de una secuencia objetivo en una plaga de coleópteros. En algunas modalidades una molécula de ARNi puede comprender secuencias de nucleótidos que son complementarias a la totalidad o parte de una pluralidad de secuencias objetivo; por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más secuencias objetivo. En modalidades particulares, la molécula de ARNi se puede producir *in vitro* o *in vivo* por un organismo modificado genéticamente, como una planta o una bacteria. También se divulgan secuencias de ADNc que pueden utilizarse para la producción de moléculas de ARNds, moléculas de ARNsi, moléculas de ARNmi o de ARNhp que son específicamente complementarias a la totalidad o parte de una secuencia objetivo en una plaga de coleópteros. Además se

describen construcciones de ADN recombinante para su uso en el logro de la transformación estable de huéspedes objetivo particulares. Los huéspedes objetivo transformados pueden expresar niveles efectivos de moléculas de ARNds, ARNsi, ARNmi o ARNhp de las construcciones de ADN recombinante. Por lo tanto, también se describe un vector de transformación de planta que comprende al menos una secuencia de nucleótidos operativamente vinculada a un promotor heterólogo funcional en una célula de planta, en donde la expresión de la(s) secuencia(s) de nucleótidos resulta en una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria específicamente a la totalidad o parte de una secuencia de destino en una plaga de coleópteros.

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico útiles para el control de plagas de coleópteros pueden incluir: todo o parte de una secuencia de ácido nucleico nativa aislada de *Diabrotica* que comprende rnapII 140 (SEQ ID NO:1); todo o parte de una secuencia de ácido nucleico nativa aislada de *Meligethes* que comprende rnapII 140 (por ejemplo, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 o SEQ ID NO: 81); secuencias de nucleótidos que cuando se expresan resultan en una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que es específicamente complementaria a la totalidad o parte de una molécula de ARN nativa que está codificada por rnapII 140 (por ejemplo, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, o SEQ ID NO:81); moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNmi y ARNhp) que comprenden al menos

una secuencia de nucleótidos específicamente complementaria a todo o parte de rnapII 140 (por ejemplo, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, or SEQ ID NO:81); secuencias de ADNc que pueden utilizarse para la producción de moléculas de ARNds, moléculas de ARNsi, moléculas de ARNmi y/o de ARNhp que son específicamente complementarias a la totalidad o parte de rnapII 140 (por ejemplo, EQ ID NO:1, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, or SEQ ID NO:81); y contrucciones de ADN recombinante para su uso en lograr la transformación estable de objetivos huéspedes particulares, en donde un huésped objetivo transformado comprende una o más de las moléculas anteriores de ácido nucleico.

B. Moléculas de Ácido Nucleico

La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, moléculas de ARNi (ARNds, ARNsi, ARNmi y ARNhp) que inhiben la expresión del gen objetivo en una célula, tejido u órgano de una plaga de coleópteros; y las moléculas de ADN capaces de ser expresadas como molécula de ARNi en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen objetivo en una célula, tejido u órgano de una plaga de coleópteros.

Algunas modalidades proporcionan una molécula de ácido nucleico aislada compuesta por al menos una (por ejemplo, una, dos, tres o más) secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que comprende: SEQ ID NOs:1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; el complemento de SEQ ID NOs:1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos

contiguos de SEQ ID NOs:1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; el
complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos
contiguos de SEQ ID NOs:1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; una
secuencia de codificación nativa de un organismo de
5 *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende SEQ ID NOs:1, 3,
4, o 5; el complemento de una secuencia de codificación
nativa de un organismo de *Diabrotica* SEQ ID NOs:1, 3, 4, o 5;
una secuencia de no codificación nativa de un organismo de
Diabrotica que se transcribe para producir una molécula de
10 ARN nativa que comprende SEQ ID NOs:1, 3, 4, o 5; el
complemento de una secuencia de no codificación nativa de un
organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una
molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NOs:1, 3, 4, o 5;
un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una
15 secuencia de codificación nativa de un organismo de
Diabrotica que comprende SEQ ID NOs:1, 3, 4, o 5; el
complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos
contiguos de una secuencia de codificación nativa de un
organismo de *Diabrotica* que comprende SEQ ID NOs:1, 3, 4, o
20 5; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de
una secuencia de no codificación nativa de un organismo de
Diabrotica que se transcribe para producir una molécula de
ARN nativa que comprende SEQ ID NOs:1, 3, 4, o 5; y el
complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos
25 contiguos de una secuencia de no codificación nativa de un
organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una
molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NOs:1, 3, 4, o 5;

una secuencia de codificación nativa de un organismo de *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende SEQ ID NOs: 73, 75, 77, o 81; el complemento de una secuencia de codificación nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende SEQ ID

5 NOs: 73, 75, 77 o 81; una secuencia de no codificación nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NOs: 73, 75, 77 o 81; el complemento de una secuencia de no codificación nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para

10 producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NOs: 73, 75, 77 o 81; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende SEQ ID NOs: 73, 75, 77 o 81; el complemento de un fragmento de por lo menos 15

15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende SEQ ID NOs: 73, 75, 77 o 81; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de no codificación nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una

20 molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NOs: 73, 75, 77 o 81; y el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de no codificación nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NOs:

25 73, 75, 77, o 81. En modalidades particulares, el contacto con o la absorción por una plaga de coleópteros de la secuencia de ácido nucleico aislada inhibe el crecimiento,

desarrollo, reproducción y alimentación de la plaga de coleópteros.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico puede comprender al menos una (por ejemplo, una, dos, tres o más) secuencia de ADN capaz de ser expresada como molécula de ARNi en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen objetivo en una célula, tejido u órgano de una plaga de coleópteros. Esta(s) secuencia(s) de ADN pueden estar operativamente vinculadas a una secuencia de promotor que funciona en una célula de la molécula de ADN para iniciar o aumentar la transcripción del ARN codificado capaz de formar una(s) molécula(s) de ARNs. En una modalidad, al menos una (por ejemplo, una, dos, tres o más) secuencias de ADN pueden derivarse de una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81. Los derivados de SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77 o 81 incluyen fragmentos de SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81. En algunas modalidades, tal fragmento puede comprender, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81, o un complemento de éstas. Por lo tanto, un fragmento tal puede comprender, por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos contiguos de SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81, o un complemento de éstas. En estas y otras modalidades, tal fragmento puede comprender, por ejemplo, más de aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NOs: 1, 3,

4, 5, 73, 75, 77, o 81, o un complemento de éstas. Por lo tanto, un fragmento de SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81 pueden comprender, por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, aproximadamente 25 (por ejemplo, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, y 29), 30, aproximadamente 30, 40, aproximadamente 40 (por ejemplo, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, y 45), 50, aproximadamente 50, 60, aproximadamente 60, 70, aproximadamente 70, 80, aproximadamente 80, 90, aproximadamente 90, 100, aproximadamente 100, 110, aproximadamente 110, 120, aproximadamente 120, 130, aproximadamente 130, 140, aproximadamente 140, 150, aproximadamente 150, 160, aproximadamente 160, 170, aproximadamente 170, 180, aproximadamente 180, 190, aproximadamente 190, 200, aproximadamente 200 o más nucleótidos contiguos de SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81, o un complemento de éstas.

Algunas modalidades comprenden la introducción de moléculas de ARNi parcial o totalmente estabilizadas en una plaga de coleópteros para inhibir la expresión de un gen objetivo en una célula, tejido u órgano de la plaga de coleópteros. Cuando se expresa como una molécula ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNmi y ARNhp) y se ingiere por una plaga coleópteros, las secuencias de ácido nucleico que comprenden uno o más fragmentos de SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77 o 81 pueden causar uno o más de la muerte, la inhibición de crecimiento, cambios en la proporción de sexos, reducción en el tamaño de la nidada, cese de infección o cese

de la alimentación por una plaga coleópteros. Por ejemplo, en algunas modalidades, se proporciona una molécula de ARNi que comprende una secuencia de nucleótidos, incluyendo de aproximadamente 15 a aproximadamente 300 nucleótidos que son sustancialmente homólogos a una secuencia del gen de la plaga de coleópteros objetivo y que comprende uno o más fragmentos de una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81. La expresión de una molécula tal de ARNs por ejemplo, puede conducir a la inhibición de mortalidad y crecimiento en una plaga de coleópteros que ingiere la molécula de ARNi.

En ciertas modalidades, las moléculas de ARNi proporcionadas en este documento comprenden las secuencias de nucleótidos complementarias a un gen objetivo que comprende las SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81 y/o secuencias de nucleótidos complementarias a un fragmento de SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77 o 81, la inhibición de la cuyo gen objetivo en una plaga de coleópteros resulta en la reducción o eliminación de un agente de secuencia de proteína o nucleótidos que es esencial para el crecimiento de la plaga de coleópteros, su desarrollo u otra función biológica. Una secuencia de nucleótidos seleccionada puede mostrar de aproximadamente 80% a 100% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77 o 81, un fragmento contiguo de la secuencia de nucleótido establecida en SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81 o el complemento de cualquiera de las anteriores. Por ejemplo, una secuencia de

nucleótidos seleccionada puede mostrar aproximadamente 81%;
 aproximadamente 82%; aproximadamente 83%; aproximadamente
 84%; aproximadamente 85%; aproximadamente 86%;
 aproximadamente 87%; aproximadamente 88%; aproximadamente
 5 89%; aproximadamente 90%; aproximadamente 91%;
 aproximadamente 92%; aproximadamente 93%; aproximadamente 94%
 aproximadamente 95%; aproximadamente 96%; aproximadamente
 97%; aproximadamente 98%; aproximadamente 98.5%;
 aproximadamente 99%; aproximadamente 99.5%; aproximadamente
 10 100%, 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%;
 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99; o 100% de
 identidad de secuencia con SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77
 o 81, un fragmento contiguo de la secuencia de nucleótido
 establecida en SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81 o el
 15 complemento de cualquiera de las anteriores.

En algunas modalidades, una molécula de ADN capaz
 de ser expresada como una molécula de ARNi en una célula o
 microorganismo para inhibir la expresión del gen objetivo
 puede abarcar una secuencia de nucleótido única
 20 específicamente complementaria a la totalidad o parte de una
 secuencia de ácido nucleico nativa que se encuentra en una o
 más especies de la plaga de coleópteros, o la molécula de ADN
 puede construirse como una quimera de una pluralidad de tales
 secuencias específicamente complementarias.

25 En algunas modalidades, una molécula de ácido
 nucleico puede abarcar una primera y una segunda secuencia de
 nucleótidos separada por una "secuencia espaciadora". Una

secuencia espaciadora puede ser una región que comprende cualquier secuencia de nucleótidos que facilita la formación de la estructura secundaria entre las secuencias nucleotídicas primera y segunda, en donde se desee. En una
5 modalidad, la secuencia espaciadora es parte de una secuencia codificadora sentido o antisentido para ARNm. La secuencia espaciadora puede abarcar alternativamente cualquier combinación de nucleótidos u homólogos de la misma que sean capaces de ser vinculados covalentemente a una molécula de
10 ácido nucleico.

Por ejemplo, en algunas modalidades, la molécula de ADN puede comprender una secuencia codificadora de nucleótidos para una o más diferentes moléculas de ARN, en donde cada una de las diferentes moléculas de ARN comprende
15 una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos, en donde las secuencias de nucleótidos primera y segunda son complementarias entre sí. Las secuencias de nucleótidos primera y segunda pueden ser conectadas dentro de una molécula de ARN por una secuencia
20 espaciadora. La secuencia espaciadora puede constituir parte de la primera secuencia de nucleótidos o la segunda secuencia de nucleótidos. La expresión de la molécula de ARN que comprende las secuencias nucleotídicas primera y segunda puede conducir a la formación de una molécula de ARNds y/
25 ARNhp, por el emparejamiento básico específico de las primera y segunda secuencias de nucleótidos. La primera secuencia de nucleótidos o la segunda secuencia de nucleótidos puede ser

sustancialmente idéntica a o complementaria a una secuencia de ácido nucleico nativa de una plaga de coleópteros (por ejemplo, un gen objetivo o secuencia transcrita de no codificación), un derivado de la misma, o una secuencia
5 complementaria a la misma.

Las moléculas de ácido nucleico de ARNds conforman hebras dobles de secuencias de ribonucleótido polimerizado y pueden incluir modificaciones a la troncal de azúcar fosfato o a los nucleósidos. Las modificaciones en la estructura del
10 ARN pueden ser adaptadas para permitir la inhibición específica. En una modalidad, las moléculas de ARNds pueden modificarse mediante un proceso enzimático ubicuo que puede generar moléculas de ARNsi. Este proceso enzimático puede utilizar una enzima de ARNse III, tal como DICER en
15 eucariotas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Ver Elbashir et al. (2001) *Nature* 411:494-498; y Hamilton y Baulcombe (1999) *Science* 286(5441):950-952. La enzima DICER o las enzimas de ARNse II funcionalmente equivalentes escinden hebras más grandes de moléculas de ARNds o ARNhp en pequeños
20 oligonucleótidos (por ejemplo, ARNsi), cada una de ellas es de unos 15-25 nucleótidos de longitud. Las moléculas de ARNsi producidas por estas enzimas tienen de 2 a 3 proyecciones de nucleótidos 3', y terminales 5' fosfato y 3' hidroxilo. Las moléculas de ARNsi generadas por las enzimas
25 ARNse III son desenrolladas y separadas en ARN de una sola hebra en la célula. Las moléculas de ARNsi después hibridan específicamente con las secuencias de ARN transcritas de un

gen objetivo y dos moléculas de ARN son degradadas posteriormente por un mecanismo degradantes de ARN celular inherente. Este proceso puede resultar en la degradación o remoción efectiva de la secuencia de ARN codificada por el gen objetivo en el organismo. El resultado es el silenciamiento post transcripcional del gen objetivo. En algunas modalidades, las moléculas de ARNsi producidas por enzimas endógenas de ARNse III de moléculas de ácido nucleico heterólogas pueden mediar eficientemente la regulación a la baja de los genes objetivo de plagas coleópteros.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico puede incluir al menos una secuencia de nucleótidos de origen no natural que puede transcribirse para producir una molécula de ARN de una sola hebra capaz de formar una molécula de ARNds *in vivo* a través de la hibridación intermolecular. Tales secuencias de ARNds típicamente se auto ensamblan y pueden ser proporcionadas en la fuente de nutrición de una plaga de coleópteros para lograr la inhibición post transcripcional de un gen objetivo. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico puede comprender dos diferentes secuencias de nucleótidos de origen no natural, cada una de las cuales es específicamente complementaria a un gen objetivo distinto en una plaga de coleópteros. Cuando una molécula de ácido nucleico se proporciona a una plaga de coleópteros, la molécula inhibe la expresión de al menos dos diferentes genes objetivo en la plaga de coleópteros.

C. Obtención de Moléculas de Ácido Nucleico

Una variedad de secuencias nativas de plagas de coleópteros puede utilizarse como secuencias objetivo para el
5 diseño de moléculas de ácido nucleico, como las moléculas de ADN y ARNi que codifican ARNi. La selección de secuencias nativas no es, sin embargo, un proceso directo. Sólo un pequeño número de secuencias nativas en la plaga de coleópteros serán objetivos efectivos. Por ejemplo, no se
10 puede predecir con certeza si una secuencia nativa determinada puede ser efectivamente regulada a la baja por las moléculas de ácido nucleico, o si la regulación a la baja de una determinada secuencia nativa tendrá un efecto perjudicial sobre el crecimiento, viabilidad, proliferación o
15 reproducción de la plaga de coleópteros. La gran mayoría de secuencias nativas de la plaga de coleópteros, como los ESTs aislados de las mismas (por ejemplo, como se indica en la patente estadounidense No. 7,612,194 y la patente estadounidense No. 7,943,819), no tienen un efecto
20 perjudicial sobre el crecimiento, viabilidad, proliferación y/o reproducción de la plaga de coleópteros, tal como WCR o NCR. Tampoco es previsible que de las secuencias nativas que pueden tener un efecto perjudicial sobre una plaga de coleópteros sean capaces de ser utilizadas en las técnicas
25 recombinantes para la expresión de moléculas de ácido nucleico complementarias a tales secuencias nativas en una planta huésped y proporcionar el efecto perjudicial sobre la

plaga de coleópteros al alimentarse sin causar daño a la planta hospedera.

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ARNi que se proporcionan en la planta hospedadora de una plaga de coleópteros) se seleccionan a secuencias objetivo de ADNc que codifican proteínas o partes de proteínas esenciales para la supervivencia de la plaga de coleópteros, tales como las secuencias de aminoácidos que participan en las vías bioquímicas metabólicas o catabólicas, la división celular, la reproducción, el metabolismo energético, la digestión, el reconocimiento de la planta hospedera, y similares. Como se describe en este documento, la ingestión de composiciones de un organismo que contiene uno o más ARNi, al menos un segmento que es específicamente complementario a por lo menos un segmento sustancialmente idéntico de ARN producido en las células del organismo de plaga objetivo, puede resultar en la muerte u otra inhibición del objetivo. Una secuencia de nucleótidos, ya sea de ADN o de ARN, derivada de una plaga de coleópteros puede utilizarse para construir las células vegetales resistentes a la infestación de las plagas de coleópteros. La planta hospedera de la plaga de coleópteros (por ejemplo, *Z. mays* o *G. max*), por ejemplo, puede ser transformada para contener una o más de las secuencias de nucleótidos derivadas de la plaga de coleópteros tal como se dispone en el presente documento. La secuencia de nucleótido transformada en el huésped puede codificar uno o más ARNi que

contienen o se forman en una secuencia de ARNds en las células o fluidos biológicos dentro del huésped transformado, poniendo a disposición el ARNds en caso de que/cuando la plaga de coleópteros forme una relación nutricional con el huésped transgénico. Esto puede resultar en la supresión de la expresión de uno o más genes en las células de la plaga de coleópteros y en última instancia, la muerte o la inhibición de su crecimiento o desarrollo.

Así, en algunas modalidades, está dirigido un gen que está esencialmente implicado en el crecimiento, desarrollo y reproducción de una plaga de coleópteros. Otros genes objetivo pueden incluir, por ejemplo, aquellos que desempeñan papeles importantes en la viabilidad de las plagas coleópteros, su movimiento, migración, crecimiento, desarrollo, infectividad, establecimiento de sitios de alimentación y reproducción. Un gen objetivo, por lo tanto, puede ser un gen de limpieza o un factor de transcripción. Además, una secuencia nativa de nucleótidos de plagas de coleópteros para su uso como se describe aquí también puede derivarse de un homólogo (por ejemplo, un ortólogo), de un gen de planta, viral, bacteriano o de insecto, cuya función es conocida por los expertos en la técnica, y cuya secuencia de nucleótidos es específicamente hibridable con el gen objetivo en el genoma de la plaga de coleópteros objetivo. Los métodos de identificación de un homólogo de un gen con una secuencia de nucleótidos conocida por su hibridación son conocidos para los expertos en la técnica.

En algunas modalidades, se divulgan métodos para la obtención de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos para producir una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNmi y ARNhp). Dicha modalidad comprende: (a) analizar uno o más gen(es) objetivo para su expresión, función y fenotipo al realizar la supresión de genes mediada por ARNi en una plaga de coleópteros; (b) sondear una biblioteca de ADNc o ADNg con una sonda que comprende todo o una parte de una secuencia de nucleótidos o un homólogo de la misma de una plaga objetivo de coleópteros que muestra una alteración (por ejemplo, reducción) en el fenotipo de crecimiento o desarrollo en un análisis de supersión mediado por ARNi; (c) identificar un clon de ADN que específicamente hibrida con la sonda; (d) aislar el clon de ADN identificado en el paso (b); (e) secuenciar el fragmento de ADNc o ADNg que comprende el clon aislado en el paso (d), en donde la molécula de ácido nucleico secuenciada comprende todas o una parte sustancial de la secuencia de ARN o un homólogo de la misma; y (f) sintetizar químicamente todo o una parte sustancial de una secuencia de gen, o un ARNsi, o ARNmi, o ARNhp, o ARNm, o ARNds.

En otras modalidades, un método para la obtención de un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos para producir una porción sustancial de una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNmi y ARNhp) incluye: (a) sintetizar el primero y el segundo cebador de oligonucleótido específicamente complementario a una porción

de una secuencia de nucleótidos nativa de una plaga de coleópteros objetivo; y (b) amplificar un inserto de ADNc o ADNg presente en un vector de clonación usando el primero y el segundo cebador de oligonucleótidos del paso (a), en donde
5 la molécula de ácido nucleico amplificada comprende una porción sustancial de una molécula de ARNsi o ARNmi o ARNhp o ARNm o ARNds.

Los ácidos nucleicos pueden ser aislados, amplificados o producidos por una serie de enfoques. Por
10 ejemplo, una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNmi y ARNhp) puede obtenerse por amplificación por PCR de una secuencia de ácido nucleico objetivo (por ejemplo, un gen objetivo o una secuencia de no codificación transcrita objetivo) derivada de una biblioteca de ADNg o ADNc, o partes
15 de la misma. El ADN o el ARN se pueden extraer de un organismo, y las bibliotecas de ácido nucleico pueden prepararse a partir de éstos usando métodos conocidos por aquellos con conocimientos ordinarios en la técnica. Las bibliotecas de ADNg o de ADNc generadas a partir de un
20 organismo objetivo pueden ser utilizadas para la amplificación por PCR y la secuenciación de genes objetivo. Un producto de PCR confirmado puede usarse como plantilla para la transcripción *in vitro* para generar ARN sentido y antisentido con mínimos promotores. Alternativamente, las
25 moléculas de ácido nucleico pueden ser sintetizadas por cualquiera de una serie de técnicas (ver, por ejemplo, Ozaki et al. (1992) *Nucleic Acids Research*, 20: 5205-5214; y

Agrawal et al. (1990) *Nucleic Acids Research*, 18: 5419-5423), incluyendo el uso de un sintetizador de ADN automatizado (por ejemplo, un sintetizador de ADN/ARN *P. E. Biosystems, Inc.* (Foster City, California) modelo 392 ó 394), usando
5 sustancias químicas estándar, como la química fosforamidita. Véase, por ejemplo, Beaucage et al. (1992) *Tetrahedron*, 48: 2223-2311; Patentes estadounidenses Nos. 4,415,732, 4,458,066, 4,725,677, 4,973,679, y 4,980,460. También se puede emplear químicas alternativas que resultan en grupos de
10 troncales no naturales, como fosfotioato, fosforamidata y similares.

Una molécula de ARN, ARNds, ARNsi, ARNmi o ARNhp se puede producir químicamente o enzimáticamente por un experto en la técnica a través de reacciones manuales o automáticas,
15 o *in vivo* en una célula que comprende una molécula de ácido nucleico formada por una secuencia que codifica la molécula de ARN, ARNds, ARNsi, ARNmi, o ARNhp. El ARN también puede ser producido por síntesis orgánica total o parcial y cualquier ribonucleótido modificado puede ser introducido por
20 síntesis orgánica o enzimática *in vitro*. Una molécula de ARN puede ser sintetizada por una ARN polimerasa celular o una ARN polimerasa bacteriófaga (por ejemplo, T3 ARN polimerasa, T7 ARN polimerasa, y SP6 ARN polimerasa). La expresión de constructos útiles para la clonación y expresión de las
25 secuencias de nucleótidos es conocida en la técnica. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5,593,874, 5,693,512, 5,698,425, 5,712,135, 5,789,214, y 5,804,693. Las

moléculas de ARN que son sintetizadas químicamente o por síntesis enzimática *in vitro* pueden ser purificadas antes de la introducción en una célula. Por ejemplo, las moléculas de ARN pueden ser purificadas de una mezcla mediante extracción con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía o una combinación de los mismos. Alternativamente, pueden utilizarse moléculas de ARN que son sintetizadas químicamente o por síntesis enzimática *in vitro* con nada o un mínimo de purificación, por ejemplo, para evitar pérdidas debido al procesamiento de las muestras. Las moléculas de ARN pueden ser secadas para almacenamiento o disueltas en una solución acuosa. La solución puede contener tampones o sales para promover el recocido y/o la estabilización de hebras dobles de moléculas de ARNs.

En modalidades, una molécula de ARNs puede formarse por una hebra de ARN única auto complementaria o de dos hebras de ARN complementarias. Las moléculas de ARNs se pueden sintetizar *in vivo* o *in vitro*. Una ARN polimerasa endógena de la célula puede mediar la transcripción de las una o dos hebras de ARN *in vivo*, o la ARN polimerasa clonada puede utilizarse para mediar la transcripción *in vivo* o *in vitro*. La inhibición post transcripcional de un gen objetivo en una plaga de coleópteros puede ser dirigida al huésped por transcripción específica en un órgano, tejido o tipo celular del huésped (por ejemplo, mediante el uso de un promotor específico de tejido); estimulación de una condición ambiental en el huésped (por ejemplo, mediante el uso de un

promotor inducible que es sensible a la infección, estrés, temperatura y/o inductores químicos); y/o ingeniería de transcripción en una etapa de desarrollo o edad del huésped (por ejemplo, mediante el uso de un promotor específico de etapa de desarrollo). Las hebras de ARN que forman una molécula de ARNs, ya sea transcrita *in vitro* o *in vivo*, pueden o no pueden ser poliadeniladas, y pueden o pueden no ser capaces de ser traducidas a un polipéptido por un aparato traslacional de la célula.

D. Vectores Recombinantes y Transformación de la Célula Huésped

En algunas modalidades, se proporciona una molécula de ADN para su introducción en una célula (por ejemplo, una célula bacteriana, una célula de levadura o una célula de planta), en donde la molécula de ADN se compone de una secuencia de nucleótidos que, sobre la expresión de ARN y la ingestión de una plaga de coleópteros, logra la supresión de un gen objetivo en una célula, tejido u órgano de la plaga de coleópteros. Por lo tanto, algunas modalidades proporcionan una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico capaz de ser expresada como una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNs, ARNsi, ARNmi y ARNhp) en una célula de planta para inhibir la expresión del gen objetivo en una plaga de coleópteros. Para iniciar o mejorar la expresión, estas moléculas de ácido nucleico recombinante pueden abarcar una o más secuencias reguladoras, dichas

secuencias reguladoras podrían vincularse operativamente con la secuencia de ácidos nucleicos capaz de ser expresada para producir una ARNi. Los métodos para expresar una molécula de supresión de genes en plantas son conocidos y pueden utilizarse para expresar una secuencia de nucleótidos. Véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT No. W006/073727; y la publicación de patente estadounidense No. 2006/0200878 A1).

En modalidades específicas, una molécula de ADN recombinante puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNs. Estas moléculas de ADN recombinantes pueden codificar moléculas de ARNs capaces de inhibir la expresión de genes endógenos objetivo en una célula de plaga de coleópteros después de la ingestión. En muchas modalidades, un ARN transcrito puede formar una molécula de ARNs que puede ser proporcionada en una forma estabilizada; por ejemplo, como una estructura de horquilla y tallo y lazo.

En estas y otras modalidades, una hebra de una molécula de ARNs se puede formar por la transcripción de una secuencia de nucleótidos que es substancialmente homóloga a la secuencia de nucleótido que comprende SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77 o 81; el complemento de SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77 o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77 o 81; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77 o 81; una

secuencia de codificación nativa de un organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende SEQ ID N0s: 1, 3, 4 o 5; el complemento de una secuencia de codificación nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende SEQ ID N0s: 1, 3, 4 o 5; una secuencia de no codificación nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID N0s: 1, 3, 4 o 5; el complemento de una secuencia de no codificación nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID N0s: 1, 3, 4 o 5; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación nativa de un organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR), que comprende SEQ ID N0s: 1, 3, 4 o 5; el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende SEQ ID N0s: 1, 3, 4 o 5; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de no codificación nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID N0s: 1, 3, 4 o 5; y el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de no codificación nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID N0s: 1, 3, 4, o 5; una secuencia de codificación nativa de un organismo de *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende SEQ ID N0s: 73, 75, 77, o 81; el complemento de una secuencia de codificación

nativa de un organismo de *Meligiethes* que comprende SEQ ID N0s:73, 75, 77, o 81; una secuencia de codificación no nativa de un organismo de *Meligiethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID N0s:73, 75, 77, o 81; el complemento de una secuencia de no codificación nativa de un organismo de *Meligiethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID N0s:73, 75, 77, o 81; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación nativa de un organismo de *Meligiethes* (por ejemplo, PB) que comprende SEQ ID N0s: 73, 75, 77, o 81; el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación nativa de un organismo de *Meligiethes* que comprende SEQ ID N0s:73, 75, 77, o 81; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de no codificación nativa de un organismo de *Meligiethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID N0s:73, 75, 77, o 81; y el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de no codificación nativa de un organismo de *Meligiethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID N0s:73, 75, 77, o 81.

En modalidades particulares, una molécula de ADN recombinante que codifica una molécula de ARNs puede comprender al menos dos segmentos de secuencia de nucleótidos dentro de una secuencia transcrita, tales secuencias dispuestas de tal manera que la secuencia transcrita

comprende un primer segmento de secuencia de nucleótidos en una orientación de sentido, y un segundo segmento de secuencia de nucleótido (compuesto por el complemento del primer segmento de secuencia de nucleótidos) en una orientación antisentido, en relación con al menos un promotor, en donde el segmento de secuencia de nucleótidos de sentido y el segmento de secuencia de nucleótidos antisentido están vinculados o conectados por un segmento de la secuencia espaciadora de cerca cinco (~5) a aproximadamente mil nucleótidos (~1000). El segmento de secuencia espaciadora puede formar un lazo entre los segmentos de secuencia sentido y antisentido. El segmento de secuencia de nucleótidos de sentido o el segmento de secuencia de nucleótidos antisentido puede ser substancialmente homólogo a la secuencia de nucleótidos de un gen objetivo (por ejemplo, un gen que comprende SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81, o un fragmento de éstas. Sin embargo, en algunas modalidades, una molécula de ADN recombinante puede codificar una molécula de ARNs sin una secuencia espaciadora. En modalidades, una secuencia de codificación de sentido y una secuencia de codificación antisentido pueden tener diferentes longitudes.

Las secuencias identificadas como que tienen un efecto perjudicial sobre las plagas de coleópteros o un efecto protector de la planta respecto a las plagas de coleópteros pueden ser fácilmente incorporadas en las moléculas de ARNs expresadas a través de la creación de cintas de expresión adecuada en una molécula de ácido

nucleico recombinante. Por ejemplo, tales secuencias pueden ser expresadas como una horquilla con estructura de tallo y lazo tomando un primer segmento correspondiente a una secuencia del gen objetivo (por ejemplo, SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81 y fragmentos de las mismas); vincular esta secuencia a un segundo segmento de región espaciadora que no es homólogo o complementario al primer segmento; y vincularla a un tercer segmento, en donde al menos una parte del tercer segmento es substancialmente complementaria al primer segmento. Tal constructo forma una estructura de tallo y lazo por emparejamiento de la base intramolecular del primer segmento con el tercer segmento, en donde la estructura de tallo forma y comprende el segundo segmento. Ver, por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidenses Nos. 2002/0048814 y 2003/0018993; y las publicaciones internacionales PCT W094/01550 y W098/05770. Se puede generar una molécula de ARNs, por ejemplo, en forma de una estructura de doble hebra tak como una estructura de lazo y tallo (por ejemplo, horquilla), en donde la producción de los ARNs dirigidos a una secuencia nativa de plaga de coleópteros es potenciada por la co-expresión de un fragmento del gen objetivo, por ejemplo en una cinta expresable de planta adicional, que conduce a la producción mejorada de ARNs, o reduce la metilación para evitar el silenciamiento génico transcripcional del promotor horquilla de ARNs.

Modalidades incluyen la introducción de una molécula de ácido nucleico recombinante en una planta (es

decir, transformación) para alcanzar niveles inhibitorios de plagas de coleópteros de la expresión de una o más moléculas de ARNi. Una molécula de ADN recombinante puede, por ejemplo, ser un vector, tal como un plásmido lineal o un
5 plásmido circular cerrado. El sistema de vector puede ser un vector plásmido único, o dos o más vectores o plásmidos que contienen juntos el ADN total a ser introducido en el genoma de un huésped. Además, un vector puede ser un vector de expresión. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico
10 pueden insertarse adecuadamente en un vector bajo el control de un promotor adecuado que funciona en uno o más huéspedes para activar la expresión de una secuencia de codificación vinculada u otra secuencia de ADN. Muchos vectores están disponibles para este propósito, y la selección del vector
15 apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos a insertarse en el vector y la célula huésped especial a ser transformada con el vector. Cada vector contiene varios componentes según su función (por ejemplo, la amplificación del ADN o expresión del ADN) y la célula
20 huésped especial con la cual es compatible.

Para impartir resistencia a las plagas de coleópteros a una planta transgénica, un ADN recombinante por ejemplo, puede ser transcrito en una molécula de ARNi (por ejemplo, una molécula de ARN que forma una molécula de ARNs)
25 dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante. Una molécula de ARNi puede componerse de una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente homóloga y específicamente

hibridable a la secuencia de nucleótido transcrita correspondiente dentro de una plaga de coleópteros que puede causar daños a las especies de plantas huésped. La plaga de coleópteros puede contactar la molécula de ARNi que se transcribe en las células de la planta huésped transgénica, por ejemplo, por la ingestión de células o fluidos de la planta huésped transgénica que comprenden la molécula de ARNi. Por lo tanto, la expresión de un gen objetivo es suprimida por la molécula de ARNi en plagas de coleópteros que infestan la planta huésped transgénica. En algunas modalidades, supresión de la expresión del gen objetivo en la plaga de coleópteros objetivo puede resultar en que la planta sea resistente al ataque de la plaga.

Para habilitar la administración de las moléculas de ARNi a una plaga de coleópteros en una relación nutricional con una célula de la planta que ha sido transformada con una molécula de ácido nucleico recombinante, se requiere la expresión (es decir, transcripción) de las moléculas de ARNi en la célula de la planta. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico recombinante puede componerse de una secuencia de nucleótidos operativamente vinculada a una o más secuencias reguladoras, tales como una secuencia de promotor heterólogo que funciona en una célula huésped, como una célula bacteriana en la que la molécula de ácido nucleico es amplificada y una célula de la planta en la cual la molécula de ácido nucleico va a expresarse.

Los promotores adecuados para su uso en moléculas

de ácido nucleico incluyen aquellas que son inducibles, virales, sintéticas, o constitutivas, todas las cuales son muy conocidas en la técnica. Ejemplos no limitantes que describen tales promotores incluyen las patentes

5 estadounidenses Nos. 6,437,217 (promotor de maíz RS81); 5,641,876 (promotor de actina del arroz); 6,426,446 (promotor de maíz RS324); 6,429,362 (promotor de maíz PR 1); 6,232,526 (promotor de maíz A3); 6,177,611 (promotores de maíz constitutivos); 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196

10 (promotor CaMV 35S); 6,433,252 (promotor de maíz L3 oleosina); 6,429,357 (promotor de actina del arroz 2, y actina del arroz 2 intrón); 6,294,714 (promotores inducibles de luz); 6,140,078 (promotores inducibles de sal); 6,252,138 (promotores inducibles de patógeno); 6,175,060 (promotores

15 inducibles de deficiencia de fósforo); 6,388,170 (promotores bidireccionales); 6,635,806 (promotor de gamma coixina); y la publicación de patente estadounidense No. 2009/757,089 (promotor de aldolasa de cloroplasto del maíz). Los promotores adicionales incluyen el promotor de nopalina

20 sintasa (NOS) (Ebert et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 84(16): 5745-5749) y los promotores de octopina sintasa (OCS) (que se realizan en plásmidos inductores de tumor de *Agrobacterium tumefaciens*); los promotores de *caulimovirus* como el promotor del virus del mosaico de la

25 coliflor (CaMV) 19S (Lawton et al. (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:315-324); el promotor 35S CaMV (Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812; el promotor del virus de mosaico de escrofularia

35S (Walker et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 84
(19):6624-6628); el promotor de sacarosa sintasa (Yang y
Russell (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 87:4144-4148);
el promotor del complejo del gen R (Chandler et al. (1989)
5 *Plant Cell* 1:1175 1183); el promotor del gen de proteína de
unión a clorofila a/b; CaMV 35S (patentes estadounidenses
Nos. 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196); FMV 35S
(Patentes estadounidenses Nos. 5,378,619 y 6,051,753); un
promotor de PC1SV (Patente estadounidense No. 5,850,019); el
10 promotor de SCP1 (Patente estadounidense No. 6,677,503); y
los promotores de AGRtu.nos (No. de Acceso GENBANK® V00087;
Depicker et al. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1:561-573; Bevan
et al. (1983) *Nature* 304:184 187).

En modalidades particulares, las moléculas de ácido
15 nucleico constituyen un promotor específico del tejido, como
un promotor específico de raíz. Los promotores específicos
de raíz conducen la expresión de secuencias codificadoras
operativamente vinculadas exclusiva o preferentemente en el
tejido radical. Se conocen ejemplos de promotores
20 específicos de raíz en la técnica. Véase, por ejemplo, las
patentes estadounidenses Nos. 5,110,732; 5,459,252 y
5,837,848; y Opperman et al. (1994) *Science* 263:221-3; y
Hirel et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 20:207-18. En algunas
modalidades, una secuencia de nucleótidos o fragmento de
25 control de plagas de coleópteros puede ser clonada entre dos
promotores específicos de raíz orientados en direcciones
opuestas transcripcionales en relación con la secuencia de

nucleótidos o fragmento, y que son operables en una célula de planta transgénica y expresadas en la misma para producir moléculas de ARN en la célula de planta transgénica que posteriormente puede formar moléculas de ARNs, como se describe, *supra*. Las moléculas de ARNi expresadas en los tejidos vegetales pueden ser ingeridas por una plaga de coleópteros para lograr la supresión de la expresión del gen objetivo.

Las secuencias reguladoras adicionales que opcionalmente pueden estar operativamente vinculadas a una molécula de ácido nucleico de interés incluyen 5'UTRs que funcionan como una secuencia de traducción líder situada entre una secuencia de promotor y una secuencia de codificación. La secuencia de traducción líder está presente en el ARNm completamente procesado, y puede afectar el proceso de la transcripción primaria y/o estabilidad del ARN. Ejemplos de secuencias de traducción líder incluyen líderes de proteína de golpe de calor de maíz y petunia (patente estadounidense No. 5,362,865), líderes de proteína de recubrimiento de virus de planta, líderes de rubisco de planta y otros. Ver, por ejemplo, Turner y Foster (1995) *Molecular Biotech.* 3(3):225-36. Ejemplos no limitantes de 5'UTRs incluyen GmHsp (Patente estadounidense No. 5,659,122); PhDnaK (Patente estadounidense No. 5,362,865); AtAnt1; TEV (Carrington y Freed (1990) *J. Virol.* 64:1590y7); y AGRtunos (No. de acceso a GENBANK® V00087; y Bevan et al. (1983) *Nature* 304:184-7).

Secuencias reguladoras adicionales que opcionalmente pueden estar operativamente vinculadas a una molécula de ácido nucleico de interés también incluyen secuencias de 3' no traducidas, regiones de terminación de la transcripción 3' o regiones de poli adenilación. Estos son elementos genéticos situados hacia abajo de una secuencia de nucleótidos e incluyen polinucleótidos que proporcionan señal de poliadenilación u otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción o el proceso de ARNm. La señal de poliadenilación en plantas funciona para causar la adición de nucleótidos de poliadenilato al extremo 3' del precursor del ARNm. La secuencia de poliadenilación puede ser derivada de una variedad de genes de planta o de los genes del ADN T. Un ejemplo de una región de terminación de transcripción 3' no limitante es la región 3' de nopalina sintasa (nos 3'; Fraley et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 80:4803-7). Un ejemplo del uso de diferentes 3' regiones no traducidas se proporciona en Ingelbrecht et al., (1989) *Plant Cell* 1:671-80. Ejemplos no limitativos de señales de poliadenilación incluyen uno del gen *Pisum sativum* RbcS2 (Ps. RbcS2 E9; Coruzzi et al. *EMBO J.* (1984) 3:1671 9) y AGRtu.nos (No. de Acceso a GENBANK® E01312).

Algunas modalidades pueden incluir un vector de transformación de planta que consta de una molécula de ADN aislada y purificada que comprende al menos una de las secuencias reguladoras descritas arriba operativamente vinculadas a una o más secuencias de nucleótidos aquí

descritos. Cuando se expresan, las una o más secuencias de nucleótidos resultan en una o más molécula(s) de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos específicamente complementaria a la totalidad o parte de una molécula de ARN nativa en una plaga de coleópteros. Por lo tanto, las secuencias de nucleótidos pueden comprender un segmento de codificación de todo o parte de una secuencia de ribonucleótido presente dentro de una transcripción objetivo del ARN de plagas de coleópteros y pueden comprender repeticiones invertidas de todo o parte de una transcripción objetivo de plagas coleópteros. Un vector de transformación de plantas puede contener secuencias específicamente complementarias a más de una secuencia objetivo, permitiendo la producción de más ARNi para inhibir la expresión de dos o más genes en células de una o más poblaciones o especies de plagas de coleópteros objetivo. Los segmentos de la secuencia de nucleótidos específicamente complementaria a las secuencias de nucleótidos presentes en diferentes genes pueden combinarse en una molécula única de ácido nucleico compuesta para su expresión en una planta transgénica. Estos segmentos pueden ser contiguos o separados por una secuencia espaciadora.

En algunas modalidades, de un plásmido que ya contiene al menos una secuencia de nucleótidos que puede ser modificada por la inserción secuencial de nucleótidos adicionales en el mismo plásmido, en donde las secuencias de nucleótidos adicionales están operativamente vinculadas con

los mismos elementos reguladores que la al menos una
secuencia de nucleótidos original. En algunas modalidades,
una molécula de ácido nucleico se puede diseñar para la
inhibición de múltiples genes objetivo. En algunas
5 modalidades, los múltiples genes a ser inhibidos pueden
obtenerse de la misma especie de plaga de coleópteros, que
puede aumentar la eficacia de la molécula de ácido nucleico.
En otras modalidades, los genes pueden derivarse de diversas
plagas de coleópteros, que pueden ampliar la gama de plagas
10 de coleópteros contra las que el agente(s) es/son
eficaz(ces). Cuando hay múltiples genes objetivo para la
supresión o una combinación de expresión y supresión, puede
fabricarse un elemento de ADN policistrónico.

Una molécula de ácido nucleico recombinante o
15 vector puede comprender un marcador seleccionable que
confiere un fenotipo seleccionable en una célula
transformada, tal como una célula de la planta. Los
marcadores seleccionables pueden usarse también para
seleccionar las plantas o las células vegetales que forman
20 una molécula de ácido nucleico recombinante. El marcador
puede codificar resistencia biocida, antibiótica (por
ejemplo, kanamicina, Geneticina (G418), bleomicina,
Higromicina, etc.), o resistencia a los herbicidas (por
ejemplo, el glifosato, etc.). Ejemplos de marcadores
25 seleccionables incluyen, pero no se limitan a: un neo gen que
codifica para la resistencia a la kanamicina y puede ser
seleccionado para el uso de kanamicina, G418, etc..; un gen

de barra que codifica para la resistencia a bialafos; un gen de EPSP sintasa mutado que codifica la resistencia al glifosato; un gen de nitrilasa que confiere resistencia a bromoxinila; un gen mutante de acetolactato sintasa (ALS) que
 5 confiere resistencia a imidazolinonas o sulfonilurea; y un gen DHFR resistente al metotrexato. Existen múltiples marcadores seleccionables que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloramfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato,
 10 fosfinotricina, puromicina, espectinomicina, rifampicina, estreptomycin y tetraciclina y similares. Ejemplos de tales marcadores seleccionables se ilustran en, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5,550,318; 5,633,435; 5,780,708 y 6,118,047.

15 Una molécula de ácido nucleico recombinante o vector también puede incluir un marcador tamizable. Los marcadores tamizables pueden usarse para supervisar la expresión. Los marcadores tamizables ejemplares incluyen un gen de β -glucuronidasa o *uidA* (GUS) que codifica una enzima
 20 para la que varios sustratos cromogénicos son conocidos (Jefferson et al. (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405); un gen locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en los tejidos de plantas (Dellaporta et al. (1988) "*Molecular*
 25 *cloning of the maize R nj allele by transposon tagging with Ac.*" En el 18th Stadler Genetics Symposium, P. Gustafson y R. Appels, eds. (New York: Plenum), pp. 263-82); a β -

lactamase gen (Sutcliffe et al. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 75:3737-41); un gen que codifica una enzima para la que se conocen varios sustratos cromogénicos (e.g., PADAC, una cefalosporina cromógena); un gen de luciferasa (Ow et al. 5 (1986) *Science* 234:856-9); un gen de xylE que codifica una dioxigenasa de catecol que puede convertir catecoles cromogénicos (Zukowski et al. (1983) *Gene* 46(2 3):247-55); un gen de amilasa (Ikata et al. (1990) *Bio/Technol.* 8:241-2); un gen de tirosinasa que codifica una enzima capaz de oxidar 10 tirosina a DOPA y dopaquinona, que a su vez se condensa a melanina (Katz et al. (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-14); y una α -galactosidasa.

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico recombinante, como se describe, *supra*, pueden 15 utilizarse en los métodos para la creación de plantas transgénicas y expresión de los ácidos nucleicos heterólogos en plantas para preparar las plantas transgénicas que muestran menor susceptibilidad a plagas de coleópteros. Los vectores de transformación de planta pueden ser preparados, 20 por ejemplo, por moléculas de inserción de ácido nucleico que codifican moléculas de ARNi en vectores de transformación de plantas y la introducción de estos en las plantas.

Los métodos adecuados para la transformación de las células huésped incluyen cualquier método por el cual el ADN 25 puede introducirse en una célula, como por la transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5,508,184), por ingesta de ADN mediada por

dsecación/inhibición (ver, por ejemplo, Potrykus et al. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:183-8), por electroporación (ver, por ejemplo, patente estadounidense No. 5,384,253) por agitación con fibras de carburo de silicio, (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5,302,523 y 5,464,765), por transformación mediada por *Agrobacterium*, (ver, por ejemplo, patentes estadounidenses Nos. 5,563,055; 5,591,616; 5,693,512; 5,824,877; 5,981,840; y 6,38,301) y por aceleración de partículas recubiertas de ADN (ver, por ejemplo, patentes estadounidenses Nos. 5,015,580, 5,550,318, 5,538,880, 6,160,208, 6,399,861 y 6,403,865), etc. Las técnicas que son particularmente útiles para transformar el maíz se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses Nos. 5,591,616, 7,060,876 y 7,939,328. A través de la aplicación de técnicas tales como éstas, las células de prácticamente cualquier especie pueden transformarse establemente. En algunas modalidades, la transformación de ADN se integra en el genoma de la célula huésped. En el caso de especies multicelulares, las células transgénicas pueden ser regeneradas en un organismo transgénico. Cualquiera de estas técnicas puede utilizarse para producir una planta transgénica, por ejemplo, comprendiendo una o más secuencias de ácido nucleico de codificación de una o más moléculas de ARNi en el genoma de la planta transgénica.

El método más ampliamente utilizado para introducir un vector de expresión en las plantas se basa en el sistema

de transformación natural de varias especies de *Agrobacterium*. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son las bacterias patógenos del suelo de la planta que transforman genéticamente las células de la planta. Los plásmidos de Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, llevan los genes responsables de la transformación genética de la planta. Los plásmidos de Ti (inductores de tumor) contienen un segmento grande, conocido como ADN T, que se transfiere a las plantas transformadas. Otro segmento del plásmido de Ti, la región de Vir, es responsable de la transferencia de ADN T. La región de ADN T está bordeada por repeticiones terminales. En vectores binarios modificados, los genes inductores de tumores han sido eliminados y las funciones de la región de Vir se utilizan para transferir ADN extraño bordeado por las secuencias de borde de ADN T. La región T también puede contener un marcador seleccionable para la recuperación eficiente de células y plantas transgénicas y un sitio de clonación múltiple para la inserción de secuencias para la transferencia tal como un ácido nucleico de codificación de ARNds.

Así, en algunas modalidades, un vector de transformación de plantas se deriva de un plásmido de Ti de *A. tumefaciens* (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 4,536,475, 4,693,977, 4,886,937, y 5,501,967; y la patente europea No. EP 0 122 791) o un plásmido Ri de *A. rhizogenes*. Los vectores de transformación de planta adicionales incluyen, por ejemplo y sin limitación,

las descritas por Herrera Estrella et al. (1983) *Nature* 303:209-13; Bevan et al. (1983) *Nature* 304:184-7; Klee et al. (1985) *Bio/Technol.* 3:637-42; y la patente europea No. EP 0 120 516 y aquellos derivados de cualquiera de los anteriores.

5 Otras bacterias como *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium* que interactúan con las plantas naturalmente pueden modificarse para mediar la transferencia de genes a un número de diversas plantas. Estas bacterias simbióticas de plantas asociadas pueden hacerse competentes en materia de
10 transferencia de genes por la adquisición de un plásmido de Ti desarmado y un vector binario adecuado.

Después de efectuar el suministro de ADN exógeno a células receptoras, las células transformadas se identifican generalmente por un mayor cultivo y regeneración de la
15 planta. Con el fin de mejorar la capacidad de identificar las células transformadas, uno puede desear emplear un gen marcador seleccionable o tamizable, como se estableció previamente, con el vector de transformación utilizado para generar el transformante. En el caso donde se utiliza un
20 marcador seleccionable, las células transformadas se identifican dentro de la población de células transformadas potencialmente al exponer las células a un agente o agentes selectivo(s). En el caso donde se utiliza un marcador tamizable, las células pueden ser tamizadas para el rasgo de
25 gen marcador deseado.

Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o las células que han sido calificadas

positivas en un análisis de proyección, pueden cultivarse en medios que soportan la regeneración de plantas. En algunas modalidades, cualquier medio de cultivo de tejidos de planta adecuado (por ejemplo, los medios MS y N6) puede ser modificado mediante la inclusión de otras sustancias, tales como reguladores de crecimiento. El tejido puede ser mantenido en un medio básico con reguladores de crecimiento hasta que suficiente tejido está disponible para iniciar esfuerzos de regeneración de plantas, o después de rondas repetidas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración (por ejemplo, típicamente cerca de 2 semanas), entonces se transfiere a medios conducentes para brotar la formación. Los cultivos son transferidos periódicamente hasta que se ha producido suficiente brote de formación. Una vez que se forman brotes, se transfirieron a medios conducentes para la formación de la raíz. Una vez que se forman suficientes raíces, las plantas pueden transferirse a la tierra para su crecimiento y maduración.

Para confirmar la presencia de una molécula de ácido nucleico de interés (por ejemplo, una secuencia de ADN que codifican una o más moléculas de ARNi que muestran la expresión del gen objetivo en una plaga de coleópteros) en las plantas de regeneración, se puede realizar una gran variedad de ensayos. Estos ensayos incluyen, por ejemplo: ensayos biológicos moleculares, tales como southern y western blot, PCR y secuenciación de ácido nucleico; ensayos

bioquímicos, tales como detectar la presencia de un producto de la proteína, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y/o inmuno blots) o por la función enzimática; ensayos de parte de planta, tales como ensayos de hoja o raíz; y análisis del fenotipo de la planta regenerada completa.

Los eventos de integración pueden ser analizados, por ejemplo, por amplificación por PCR usando, por ejemplo, los cebadores del oligonucleótido específico para una molécula de ácido nucleico de interés. El genotipado de PCR se entiende que incluye, pero no se limita a, reacción de cadena de polimerasa (PCR) de la amplificación del ADN genómico derivado de tejido de callo de planta huésped aislada que se espera que contenga una molécula de ácido nucleico de interés integrada en el genoma, seguido de análisis estándar de clonación y análisis de secuencia de los productos de amplificación de PCR. Los métodos de genotipado de PCR se han descrito bien (por ejemplo, Rios, G. et al. (2002) *Plant J.* 32:243-53) y pueden aplicarse al ADN genómico derivado de cualquier especie de plantas (por ejemplo, *Z. mays* o *G. max*) o tipo de tejido, incluyendo cultivos celulares.

Una planta transgénica formada usando métodos de transformación dependiente de *Agrobacterium* contiene típicamente sólo una secuencia de ADN recombinante insertada en un cromosoma. La única secuencia de ADN recombinante se conoce como un "evento transgénico" o "evento de integración". Tales plantas transgénicas son hemicigólicas

para la secuencia exógena insertada. En algunas modalidades, una planta transgénica homocigótica con respecto a un transgen puede obtenerse por el apareamiento sexual (autofecundación) de una planta transgénica segregante independiente que contiene una secuencia de genes exógenos para sí misma, por ejemplo una planta T_0 , para producir semilla T_1 . Una cuarta parte de la semilla T_1 producida será homocigótica con respecto al transgén. El germinado de la semilla T_1 resulta en plantas que pueden ser probadas para heterocigoto, típicamente mediante un ensayo SNP o un ensayo de amplificación térmica que permite la distinción entre heterocigotos y homocigotos (es decir, un ensayo de cigosidad).

En modalidades particulares, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más moléculas diferentes de ARNi que tienen un efecto inhibitorio en la plaga de coleópteros se producen en una célula de planta. Las moléculas de ARNi (por ejemplo, las moléculas de ARNds) pueden expresarse de múltiples secuencias de ácido nucleico introducidas en diferentes eventos de transformación, o de una sola secuencia de ácido nucleico introducida en un solo evento de transformación. En algunas modalidades, una pluralidad de moléculas de ARNi se expresa bajo el control de un promotor individual. En otras modalidades, una pluralidad de moléculas de ARNi se expresa bajo el control de múltiples promotores. Las moléculas únicas de ARNi pueden ser expresadas que comprenden múltiples secuencias de ácido nucleico que son cada una homólogas a

diferentes locus dentro de una o más plagas de coleópteros (por ejemplo, el locus definido por SEQ ID NOs:1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, y 81), ambos en diferentes poblaciones de la misma especie de plaga de coleópteros, o en diferentes especies de plagas de coleópteros.

Además de la transformación directa de una planta con una molécula de ácido nucleico recombinante, las plantas transgénicas pueden ser preparadas cruzando una primera planta teniendo al menos un evento transgénico con una segunda planta que carecer de tal evento. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARNi puede introducirse en una primera línea de la planta que es susceptible de transformación para producir una planta transgénica, dicha planta transgénica puede ser cruzada con una segunda línea de planta para la introgresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de ARNi en la segunda línea de la planta.

También se incluyen productos básicos que contienen una o más de las secuencias aquí descritas. Modalidades particulares incluyen productos básicos producidos a partir de una planta o semilla recombinante que contiene una o más de las secuencias de nucleótidos aquí descritos. Un producto básico que contiene una o más de las secuencias aquí descritas pretende incluir, pero no se limita a, comidas, aceites, granos enteros o triturados o semillas de una planta, o cualquier alimento o producto compuesto por harina,

aceite o grano triturado o entero de una planta o semilla recombinante que contiene una o más de las secuencias aquí divulgadas. La detección de una o más de las secuencias aquí divulgadas en una o más materias primas o productos básicos contemplados en el presente es de hecho evidencia de que la materia prima o producto básico de las materias primas se produce de una planta transgénica diseñada para expresar una o más de las secuencias de nucleótidos aquí divulgadas a efectos de controlar las plagas de plantas de coleópteros usando métodos de supresión genética mediada por ARNi.

En algunos aspectos, las semillas y productos básicos producidos por las plantas transgénicas derivadas de las células vegetales transformadas están incluidos, en donde las semillas o productos básicos comprenden una cantidad detectable de una secuencia de ácido nucleico aquí divulgada. En algunas modalidades, dichos productos básicos pueden ser producidos, por ejemplo, por la obtención de plantas transgénicas y preparando alimentos para o alimentándolas de los mismos. Los productos básicos que comprenden una o más de las secuencias de ácido nucleico aquí divulgadas incluyen, por ejemplo y sin limitación: comidas, aceites, granos enteros o triturados o semillas de una planta y cualquier producto alimenticio que comprenda cualquier comida, aceite o grano triturado o entero de una planta o semilla recombinante compuesta por una o más de las secuencias de ácido nucleico aquí divulgadas. La detección de una o más de las secuencias aquí divulgadas en una o más materias primas o productos

básicos es de hecho evidencia de que la materia prima o producto básico se produce de una planta transgénica diseñada para expresar una o más de las moléculas de ARNi aquí divulgadas a efectos de controlar las plagas de coleópteros.

5 En algunas modalidades, una planta o semilla transgénica compuesta por una molécula de ácido nucleico aquí divulgada también puede comprender por lo menos uno u otro evento transgénico en su genoma, incluyendo, sin limitación: un evento transgénico del que se transcribe una molécula de
10 ARNi dirigida a un locus en una plaga de coleópteros distinto al definido por SSEQ ID NOs:1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, y 81, tales como, por ejemplo, uno o más locus seleccionados del grupo que comprende Caf1 180 (Publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2012/0174258), VatpaseC
15 (Publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2012/0174259), Rho1 (Publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2012/0174260), VatpaseH (Publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2012/0198586), PPI 87B (Publicación de solicitud de patente estadounidense No.
20 2013/0091600), RPA70 (Publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2013/0091601) y RPS6 (Publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2013/0097730); un evento transgénico para el que se transcribe una molécula de
25 ARNi dirigida a un gen en un organismo que no sea una plaga de coleópteros (por ejemplo, un nemátodo parásito de planta); un gen que codifica una proteína insecticida (por ejemplo, una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*,

tal como, por ejemplo, Cry34Ab1 (Patente estadounidense Nos. 6,127,180, 6,340,593, y 6,624,145), Cry35Ab1 (Patente estadounidense Nos. 6,083,499, 6,340,593, y 6,548,291), una combinación de "Cry34/35Ab1" en un solo evento (e.g., evento
5 de maíz DAS 59122-7; patente estadounidense No. 7,323,556), Cry3A (por ejemplo, patente estadounidense No. 7,230,167), Cry3B (por ejemplo, patente estadounidense No. 8,101,826), Cry6A (por ejemplo, patente estadounidense No. 6,831,062) y sus combinaciones (por ejemplo, solicitudes de patente
10 estadounidenses Nos. 2013/0167268, 0167269/2013 y 2013/0180016); un gen de tolerancia a herbicidas (por ejemplo, un gen que proporciona tolerancia al glifosato, glufosinato, dicamba o 2,4 D (por ejemplo, patente estadounidense No. 7,838,733)); y un gen contribuyendo a un
15 fenotipo deseable en la planta transgénica, tal como aumento del rendimiento, metabolismo de ácidos grasos alterado o restauración de la androesterilidad citoplasmática). En modalidades particulares, las secuencias de codificación de moléculas de ARNi aquí divulgadas pueden combinarse con otro
20 control de insectos o con rasgos de resistencia a la enfermedad en una planta para lograr los rasgos deseados para mejorar el control de daño por insectos y enfermedad de la planta. La combinación de los rasgos de control de insectos que emplean distintos modos de acción puede proporcionar
25 plantas transgénicas protegidas con durabilidad superior sobre las plantas que albergan un rasgo único de control, por ejemplo, debido a la reducida probabilidad de que la

resistencia a los rasgos se desarrolle en el campo.

V. Supresión de Gen Objetivo en una Plaga de Coleópteros

5

A. Información General

En algunas modalidades, por lo menos una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de coleópteros puede ser proporcionada a una plaga de coleópteros, en donde las moléculas de ácido nucleico llevan al silenciamiento de genes mediado por ARNi en la plaga de coleópteros. En modalidades particulares, una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNmi y ARNhp) puede ser proporcionada a la plaga de coleópteros. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de coleópteros puede ser proporcionada a una plaga de coleópteros contactando la molécula de ácido nucleico con la plaga de coleópteros. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de coleópteros puede ser proporcionada en un sustrato de alimentación a la plaga de coleópteros, por ejemplo, una composición nutricional. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de coleópteros puede proporcionarse a través de la ingestión del material vegetal que comprende la molécula de ácido nucleico que es ingerida por las plagas de coleópteros. En ciertas modalidades, la molécula de ácido

nucleico está presente en el material vegetal a través de la expresión de una secuencia de ácido nucleico recombinante introducida en el material vegetal, por ejemplo, mediante la transformación de una célula de la planta con un vector que
5 comprende la secuencia de ácido nucleico recombinante y la regeneración de un material vegetal o de toda la planta a partir de la célula de la planta transformada.

B. Supresión de Gen Objetivo Mediada de ARNi

10 En las modalidades, se proporcionan las moléculas ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNmi y ARNhp) que pueden estar diseñadas para las secuencias de nucleótidos nativas esenciales de objetivo (por ejemplo, genes esenciales) en el transcriptoma de plaga coleópteros (por ejemplo, WCR o NCR o
15 PB) por ejemplo mediante el diseño de una molécula de ARNi que comprende al menos un cadena formado por una secuencia de nucleótidos complementaria específicamente la secuencia objetivo. La secuencia de la molécula de ARNi diseñada puede ser idéntica o complementariamente de manera completa a la
20 secuencia objetivo, o puede incorporar los desajustes que no impidan la hibridación específica entre la molécula de ARNi y su secuencia objetivo.

Las moléculas ARNi según se describen en el presente pueden utilizarse en los métodos de supresión del
25 gen en una plaga de coleópteros, reduciendo el nivel o la incidencia de daños causados por la plaga en una planta (por ejemplo, una planta transformada protegida que comprende una

molécula de ARNi). Como se utiliza en este documento, el término "supresión del gen" se refiere a cualquiera de los métodos conocidos para reducir los niveles de proteína producidos como resultado de la transcripción genética al ARNm y posterior traducción del ARNm, incluyendo la reducción de la expresión de un gen o una secuencia de codificación incluyendo post inhibición transcripcional de la expresión y la represión transcripcional de la proteína. La inhibición post-transcripcional está mediada por homología específica entre todos o una parte de un ARNm transcrito de un gen destinado a la represión y la correspondiente molécula ARNi utilizada para suprimir. Además, la inhibición post-transcripcional se refiere a la reducción sustancial y mensurable de la cantidad de ARNm disponibles en la celda para el enlace por ribosomas.

En las modalidades en donde una molécula ARNi es una molécula de ARNds, la molécula de ARNds puede ser adherida por la enzima DICER, en moléculas de ARNsi cortas (aproximadamente 20 nucleótidos de largo). La molécula ARNsi en cadena doble generada por la actividad DICER sobre la molécula de ARNds puede dividirse en dos siRNAs en cadena simples; el "concentración pasajera" y la "concentración guía". La concentración pasajera puede ser degradada y la concentración guía puede ser incorporada en RISC. La inhibición post-transcripcional ocurre por hibridación específica de la concentración guía con una secuencia complementaria específicamente de una molécula de ARNm y el

clivaje posterior por la enzima, Argonaute (componente catalítico del complejo RISC).

En las modalidades, se puede utilizar cualquier forma de la molécula de ARNi. Los especialistas en la técnica entenderá que las moléculas ARNds típicamente son más estables que las moléculas de ARN en cadena simple, durante la preparación y durante el paso de ofrecer la molécula ARNi a una celda y suelen ser también más estables en una celda. Así, mientras que las moléculas de ARNsi y ARNmi, por ejemplo, pueden ser igualmente efectivas en algunas modalidades, una molécula de ARNds puede ser elegida debido a su estabilidad.

En modalidades particulares, una molécula de ácido nucleico siempre consta de una secuencia de nucleótidos, cuya secuencia de nucleótidos puede transcribirse in vitro para producir una molécula de ARNi que es substancialmente homóloga a una molécula de ácido nucleico codificada por una secuencia de nucleótidos en el genoma de una plaga de coleópteros. En ciertas modalidades, la molécula de ARNi transcrito in vitro puede ser una molécula estabilizada ARNds que consta de una estructura de bucle de tallo. Después que una plaga de coleópteros entra en contacto con la molécula de ARNi transcrito in vitro, inhibición post-transcripcional de un gen objetivo en la plaga de coleópteros (por ejemplo, un gen esencial) puede ocurrir.

En algunas modalidades, expresión de una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 15 nucleótidos

contiguos de una secuencia de nucleótidos se utiliza en un método para la inhibición de post transcripcional de un gen objetivo en una plaga de coleópteros, en el que la secuencia de nucleótidos se selecciona entre el grupo constituido por:

5 SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; el complemento de la SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o

10 81; una secuencia de codificación nativa de un organismo Diabrotica (por ejemplo, RGC) que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; el complemento de una secuencia de codificación nativa de un organismo Diabrotica que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; una secuencia de codificación no nativa de un organismo Diabrotica que se transcribe para producir una

15 molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; el complemento de una secuencia codificante no nativa de un organismo Diabrotica que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o

20 5; el complemento de una secuencia codificante no nativa de un organismo Diabrotica que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación nativa de un organismo Diabrotica

25 (por ejemplo, RGC) que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación nativa de un

organismo Diabrotica que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación no nativa de un organismo Diabrotica que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación no nativa de un organismo Diabrotica que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; una secuencia de codificación nativa de un organismo Meligethes (por ejemplo, PB) que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; el complemento de una secuencia de codificación nativa de un organismo Meligethes que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; una secuencia de codificación no nativa de un organismo Meligethes que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; el complemento de una secuencia codificante no nativa de un organismo Meligethes que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; el complemento de una secuencia codificante no nativa de un organismo Meligethes que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación nativa de un organismo Meligethes (por ejemplo, PB) que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos

contiguos de una secuencia de codificación nativa de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación no nativa de un organismo

5 *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación no nativa de un organismo *Meligethes* que se transcribe para producir una

10 molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81. En ciertas modalidades, la expresión de una molécula de ácido nucleico que es al menos 80% idéntica (por ejemplo, 80%, aproximadamente el 81%, aproximadamente el 82%,

aproximadamente el 83%, aproximadamente el 84%,

15 aproximadamente el 85%, aproximadamente el 86%, aproximadamente el 87%, aproximadamente el 88%, aproximadamente el 89%, aproximadamente el 90%,

aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%,

20 aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, aproximadamente el 100%, 81% , 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% y 100%) con cualquiera de los

25 anteriores puede ser utilizado. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico puede ser expresada que hibrida específicamente con una molécula de ARN presente en

al menos una célula de una plaga de coleopterán.

En algunas modalidades, la expresión de al menos una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos puede ser utilizado en un método para la inhibición de post transcripcional de un gen objetivo en una plaga de coleópteros, en el que la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; el complemento de la SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; una secuencia de codificación nativa de un organismo Diabrotica (por ejemplo, RGC) que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; el complemento de una secuencia de codificación nativa de un organismo Diabrotica (por ejemplo, RGC) que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 o una secuencia de codificación no nativa de un organismo Diabrotica que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; el complemento de una secuencia codificante no nativa de un organismo Diabrotica que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación nativa de un organismo Diabrotica (por ejemplo, RGC) que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; el complemento de un fragmento de al menos 15

nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación nativa de un organismo *Diabrotica* que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación no nativa de un organismo *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación no nativa de un organismo *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5; una secuencia de codificación nativa de un organismo *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; el complemento de una secuencia de codificación nativa de un organismo *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; una secuencia de codificación no nativa de un organismo *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; el complemento de una secuencia codificante no nativa de un organismo *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación nativa de un organismo *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación nativa de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77,

o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación no nativa de un organismo *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; y el

5 complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de codificación no nativa de un organismo *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativo que comprende la SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81. En ciertas modalidades, la expresión de una

10 molécula de ácido nucleico que es al menos 80% idéntica (por ejemplo, 80%, aproximadamente el 81%, aproximadamente el 82%, aproximadamente el 83%, aproximadamente el 84%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 86%, aproximadamente el 87%, aproximadamente el 88%,

15 aproximadamente el 89%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%,

20 aproximadamente el 99%, aproximadamente el 100%, 81% , 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% y 100%) con cualquiera de los anteriores puede ser utilizado. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico puede ser expresada que

25 hibrida específicamente con una molécula de ARN presente en al menos una célula de una plaga de coleópteros. En ejemplos particulares, una molécula de ácido nucleico puede comprender

una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81.

Es una característica importante de algunas modalidades que el sistema de inhibición post-transcripcional ARNi es capaz de tolerar las variaciones de la secuencia entre genes objetivo que podría esperarse debido a la mutación genética, cepa polimorfismo o divergencia evolutiva. La molécula de ácido nucleico introducidas no deba ser absolutamente homólogas a un producto primario transcripción o un ARNm completamente procesados de un gen objetivo, mientras que la molécula de ácido nucleico introducido sea hibridizable específicamente a un producto primario transcripción o un ARN mcompletamente procesados del gen objetivo. Por otra parte, la molécula de ácido nucleico introducida no puede necesitar tener una longitud completa, en relación con un producto de transcripción primario o un ARNm del gen objetivo.

La inhibición de un gen objetivo usando la tecnología de ARNi descrito en el presente es secuencia específica; es decir, secuencias de nucleótidos substancialmente homólogas a la molécula(s) ARNi completamente procesada son destinadas a la inhibición de la genética. En algunas modalidades, una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a una complementaria o a una porción de una secuencia del gen objetivo puede utilizarse para la inhibición. En estas y otras modalidades, una molécula de ARN que comprende una

secuencia de nucleótidos con uno o más inserciones, borrado,
 o mutaciones de punto en relación con una secuencia del gen
 objetivo puede utilizarse. En modalidades particulares, una
 molécula de ARNi y una porción de un gen objetivo pueden
 5 compartir, por ejemplo, al menos de alrededor del 80%, por lo
 menos desde alrededor del 81%, por lo menos de 82%, por lo
 menos de 83%, por lo menos de aproximadamente el 84%, por lo
 menos de alrededor del 85%, por lo menos desde cerca de 86%,
 por lo menos de aproximadamente 87%, por lo menos desde
 10 aproximadamente el 88%, por lo menos de aproximadamente 89%,
 por lo menos de cerca del 90%, por lo menos de 91%, por lo
 menos de aproximadamente 92%, al menos de cerca del 93%, por
 lo menos de 94%, por lo menos de alrededor del 95%, por lo
 menos de aproximadamente 96%, por lo menos de aproximadamente
 15 97%, por lo menos de aproximadamente 98%, por lo menos de
 alrededor del 99%, por lo menos desde 100%, 81%, 82%, 83%,
 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,
 96%, 97%, 98%, 99%, y 100% de identidad de secuencia.
 Alternativamente, la región de dos caras de una molécula de
 20 ARNs puede ser específicamente hibridizable con una porción
 de la transcripción de genes objetivo. En concreto las
 moléculas hibridizables, una secuencia de longitud menos
 completo que exhibe una mayor homología compensa una
 secuencia más larga y menos homóloga. La longitud de la
 25 secuencia de nucleótidos de una región dos caras de una
 molécula de ARNs que es idéntica o una complementaria o a una
 porción de la transcripción de genes objetivo puede ser por

lo menos 15, 20, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, or at least about 1000, or 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, o 1000 bases. En algunas modalidades, se puede utilizar una
5 secuencia de más de 20 a 100 nucleótidos. En particular deben utilizarse modalidades, una secuencia de más de unos 100 a 200 nucleótidos, 200 a 300 nucleótidos, o 300 a 500 nucleótidos. En particulares modalidades, puede utilizarse una secuencia de más de unos 500 a 1000 nucleótidos,
10 dependiendo del tamaño del gen objetivo.

En ciertas modalidades, la expresión de un gen objetivo en una plaga de coleópteros puede ser inhibida por al menos 10%; al menos 33%; por lo menos el 50%; o por lo menos 80% dentro de una célula de la plaga de coleópteros,
15 tales que se genera una inhibición significativa. La inhibición significativa se refiere a la inhibición sobre un umbral que resulta en un fenotipo detectable (por ejemplo, cese de crecimiento, cese de la alimentación, cese del desarrollo, la mortalidad inducida, etc.), o una disminución perceptible en ARN o producto de gen correspondiente al gen
20 objetivo a ser inhibido. Aunque en ciertas modalidades, la inhibición ocurre en substancialmente todas las células de la plaga de coleópteros, en otras modalidades de la inhibición se produce sólo en un subconjunto de las células que expresan
25 el gen objetivo.

En algunas modalidades, la represión transcripcional en una celda está mediada por la presencia de

una molécula de ARNi exhibiendo identidad substancial
secuencia a una secuencia de ADN del promotor o el
complemento, a efecto de lo que se conoce como "supresión del
promotor trans." La supresión del gen puede ser efectiva
5 contra los genes objetivo en una plaga de coleópteros que
pueden ingerir o estar en contacto con estas moléculas de
ARNi, por ejemplo, por ingestión o contacto con material
vegetal que contiene las moléculas ARNds. Las moléculas ARNi
para su uso en la trans supresión promotora pueden ser
10 diseñadas específicamente para inhibir o reprimir la
expresión de una o más secuencias homólogas o complementarias
en las células de la plaga de coleópteros. La supresión de
genes post-transcripcionales por antisentido o sentido
orientado a ARN para regular la expresión génica en células
15 de la planta es divulgada en Estados Unidos patente N°
5,107,065, 5,231,020, 5,283,184 y 5.759.829.

C. expresión de las moléculas ARNi proporcionan a una plaga de coleóptero

20 La expresión de moléculas de ARNi de ARNi mediada
por la inhibición de genes en un plaga de coleóptero puede
realizarse en cualquiera de los muchos formatos in vitro o in
vivo. Las moléculas de ARNi entonces pueden ser
proporcionadas a una plaga de coleópteros o hemípteros, por
25 ejemplo, contactándose con la plaga las moléculas ARNi, o
causando la plaga a ingerir o lo contrario internalizar las
moléculas ARNi. Algunas modalidades incluyen plantas

hospederas transformadas de una plaga de coleópteros, las células vegetales transformadas y progenie de plantas transformadas. Las células de plantas transformadas y plantas transformadas pueden diseñarse para expresar uno o más de las moléculas de ARNi, por ejemplo, bajo el control de un promotor heterólogo, para proporcionar un efecto protector de plagas. Así, cuando una planta transgénica o célula de la planta es consumida por una plaga de coleópteros durante la alimentación, las plagas pueden ingerir ARNi moléculas expresadas en las plantas transgénicas o células. Las secuencias de nucleótidos descrito en el presente también pueden introducirse en una amplia variedad de los microorganismos procarióticos y eucarióticos para producir moléculas de ARNi. El término "microorganismo" incluye especies procariotas y eucariotas, tales como bacterias y hongos.

La modulación de la expresión génica puede incluir la supresión total o parcial de esa expresión. En otra modalidad, un método para la supresión de la expresión génica en una plaga de coleópteros comprende proporcionar en los tejidos del huésped de la plaga una cantidad represivo del gen de por lo menos una molécula de ARNi formada tras la transcripción de una secuencia de nucleótidos como se describe en este documento, por lo menos un segmento del cual es complementario a una secuencia de ARNm dentro de las células de la plaga de coleópteros. Una molécula de ARNi, incluyendo su forma modificada como una molécula ARNds,

ARNsi, ARNmi o ARNhp, ingerida por un plaga de coleóptero, puede ser al menos de cerca de 80%, alrededor del 81%, 82%, 83%, alrededor del 84%, alrededor del 85%, cerca de 86%, alrededor del 87%, alrededor del 88%, alrededor del 89%, 90%, 91%, alrededor del 92%, aproximadamente el 93%, cerca de 94%, 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, 99%, aproximadamente el 100% 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica o complementaria a una molécula de ARN transcrito de una molécula de ácido nucleico formado por una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, or 81. Las moléculas de ácido nucleico aislada y purificada sustancialmente incluyendo pero no limitado a, sin ocurrir de forma natural las secuencias de nucleótidos y ADN recombinante construye para proporcionar moléculas ARNi, por lo tanto, cuentan, que suprimen o inhiben la expresión de una secuencia de codificación endógena o un objetivo en la plaga de coleópteros cuando se introdujo a la misma.

Las modalidades particulares proporcionan un sistema de entrega para la entrega de ARNi moléculas para la inhibición post transcripcional de los genes objetivo uno o más de una plaga vegetal de coleópteros y el control de una población de la plaga vegetal de coleópteros. En algunas modalidades, el sistema de suministro comprende la ingestión de una célula de la planta transgénica de huésped o el contenido de la célula huésped, compuesto por moléculas de ARN transcritas en la célula huésped. En estas y otras

modalidades, una célula vegetal transgénica o una planta transgénica se crea que contiene una estructura de ADN recombinante proporcionando una molécula ARNs estabilizado. Las células vegetales transgénicos y las plantas transgénicas que comprende las secuencias de ácido nucleico codificar una molécula particular ARNi pueden producirse mediante el empleo de las tecnologías de ADN recombinante (que las tecnologías básicas son bien conocidas en el arte) para construir un vector de transformación de plantas que comprende una secuencia de nucleótidos codifican una molécula ARNi (por ejemplo, una molécula estabilizada ARNs); para transformar una célula de la planta o plantas; y para generar la célula de la planta transgénica o las plantas transgénicas que contiene la molécula transcrito ARNi.

Para impartir resistencia a las plagas de coleópteros a una planta transgénica, una molécula de ADN recombinante puede ser transcrita por ejemplo, para producir una molécula de ARNi, como una molécula de ARNs, una molécula de ARNsi, una molécula ARNmi o una molécula de ARNhp. En algunas modalidades, una molécula de ARN transcrita de una molécula de ADN recombinante puede formar una molécula de ARNs dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante o dentro de los tejidos o fluidos de un organismo contactado o que ingiere la molécula ARN. Dicha molécula ARNi puede comprender en parte de una secuencia de nucleótidos que es idéntica o complementaria a una secuencia de nucleótidos correspondientes transcrita de una secuencia

de ADN dentro de una plaga de un tipo que puede infestar la planta hospedera de coleópteros. La expresión de un gen objetivo dentro de la plaga de coleópteros es suprimida por la molécula de ARNi ingerida y la supresión de la expresión del gen objetivo en los resultados de coleópteros plaga en, por ejemplo, cese de la alimentación por la plaga de coleópteros, con un resultado final, por ejemplo, que la planta transgénica está protegida de los daños por la plaga de coleópteros. Los efectos moduladores de moléculas ARNi se han demostrado que son aplicables a una variedad de genes expresados en plagas, incluyendo, por ejemplo, genes endógenos responsables del metabolismo celular o transformación celular, incluyendo genes de mantenimiento de la casa; factores de transcripción; genes relacionados con muda; y otros genes que codifican polipéptidos involucrados en el metabolismo celular o el crecimiento normal y desarrollo.

Para la transcripción de un transgen en vivo o un constructo de expresión, una región reguladora (por ejemplo, promotor, potenciador, silenciador y señal de poliadenilación) puede utilizarse en algunas modalidades para regular la producción de la hebra ARN (o hebras). Por lo tanto, en algunas modalidades, como se establece adelante, una secuencia de nucleótidos para su uso en la producción de moléculas de ARNi puede estar operablemente ligada a una o más secuencias promotoras funcionales en una célula de la planta huésped. El promotor puede ser un promotor endógeno,

normalmente residente en el genoma del anfitrión. La secuencia nucleotídica presente, bajo el control de una secuencia promotor operablemente vinculado, además puede ser flanqueada por secuencias adicionales que afectan
5 ventajosamente su transcripción o la estabilidad de una transcripción resultante. Tales secuencias pueden estar situadas aguas arriba del promotor operablemente enlazado, aguas abajo del extremo 3' de la construcción de la expresión y pueden ocurrir tanto aguas arriba del promotor y aguas
10 abajo del extremo 3' de la construcción de la expresión.

Algunas modalidades proporcionan métodos para reducir el daño a la planta de huésped (por ejemplo, una planta de maíz) causada por una plaga de coleópteros que se alimenta de la planta, en donde el método comprende
15 proporcionando en el huésped una célula de la planta transformada expresando por lo menos una molécula de ácido nucleico descritos en el presente, en donde funciona la molécula de ácido nucleico (s) a ser tomados por la plaga de coleópteros para inhibir la expresión de una secuencia
20 objetivo dentro de la planta la plaga de coleópteros, resulta que la inhibición de la expresión en la mortalidad, redujo el crecimiento o reproducción de la plaga de coleópteros, reduciendo los daños a la planta hospedera causada por el parásito de coleópteros reducido. En algunas modalidades, la
25 molécula de ácido nucleico (s) forma moléculas ARNi. En estas y otras modalidades, la molécula de ácido nucleico (s) comprende moléculas ARNi que cada uno compone de más de una

secuencia de nucleótidos es específicamente hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga coleópteros. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico (s) consiste en una secuencia de nucleótidos es específicamente hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de coleópteros o hemípteros plaga.

En algunas modalidades, se proporciona un método para aumentar el rendimiento de un cultivo o cosecha de maíz, en donde el método comprende introducir en una planta de maíz por lo menos una molécula de ácido nucleico descrito en el presente; cultivar la planta de maíz para permitir la expresión de la molécula de ARNi que comprende la secuencia de ácido nucleico, en el cual la expresión de la molécula de ARNi que comprende la secuencia de ácido nucleico inhibe crecimiento plaga de coleóptero o daños provocados por plagas de coleópteros, así reduciendo o eliminando una pérdida de rendimiento debido a la infestación de plagas de coleópteros. En algunas modalidades, la molécula de ARNi es una molécula de ARNds. En estas y otras modalidades, la molécula de ácido nucleico (s) codifica moléculas ARNi que cada uno compone de más de una secuencia de nucleótidos es específicamente hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga coleópteros. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico (s) consiste en una secuencia de nucleótidos es específicamente hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de

coleópteros.

En algunas modalidades, un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de plaga de coleópteros puede abarcar: transformación de una célula de la planta con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico codificación por lo menos una molécula de ácido nucleico, en donde la secuencia de nucleótidos es operativamente vinculada a una promotora y una secuencia de terminación de transcripción; cultivo de la célula de la planta transformada en condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo de célula vegetal incluyendo una pluralidad de células vegetales transformados; selección de las células vegetales transformadas que la molécula de ácido nucleico se han integrado en sus genomas; detección de las células de la planta transformada para la expresión de la molécula de ARNi codificada por la molécula de ácido nucleico integrado; selección de una célula vegetal transgénico que expresa la molécula ARNi; y alimentación de la célula de la planta transgénica seleccionados a la plaga de coleópteros. Las plantas también pueden ser regeneradas de células vegetales transformadas que expresan una molécula ARNi codificada por la molécula de ácido nucleico integrado. En algunas modalidades, la molécula de ARNi es una molécula de ARNds. En estas y otras modalidades, la molécula de ácido nucleico (s) comprende moléculas ARNds que cada uno compone de más de una secuencia de nucleótidos es específicamente hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresada en

una célula de plaga de coleópteros. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico (s) consiste en una secuencia de nucleótidos es específicamente hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros.

Las moléculas ARNi pueden ser incorporadas dentro de las semillas de una especie vegetal (por ejemplo, maíz), ya sea como un producto de la expresión de un gen recombinante incorporado en el genoma de las células vegetales o como se incorpora en una capa o tratamiento de semilla que se aplica a la semilla antes de plantar. Una célula de la planta que comprende un gen recombinante se considera que es un evento transgénico. En las modalidades también figuran sistemas de suministro para el suministro de las moléculas de ARNi a plagas de coleópteros. Por ejemplo, las moléculas de ARNi pueden introducirse directamente en las células de una plaga de coleópteros. Los métodos para la introducción pueden incluir mezcla directa de ARNi con tejido vegetal desde un huésped para el plaga de coleóptero, así como aplicación de composiciones que comprende ARNi para el tejido de la planta huésped. Por ejemplo, las moléculas de ARNi se pueden rociar sobre una superficie de planta. Alternativamente, una molécula de ARNi puede ser expresada por un microorganismo, y el microorganismo puede ser aplicado sobre la superficie de la planta, o introducido en una raíz o tallo por un medio físico como una inyección. Como hemos comentado, supra, una planta transgénica puede también ser

genéticamente ideada para expresar al menos una molécula ARNi en una cantidad suficiente para matar las plagas de coleópteros conocidas que infestan la planta. Las moléculas ARNi producidas por síntesis química o enzimática también pueden ser formuladas de una manera consistente con las prácticas agrícolas comunes y usadas como pulverización en productos para el control de daños a las plantas por una plaga de coleópteros. Las formulaciones pueden incluir las etiquetas adecuadas y objetos húmeros requeridos para que la eficiente cobertura foliar, así como protectores de rayos UV para proteger ARNi moléculas (por ejemplo, las moléculas ARNds) contra daño UV. Dichos aditivos se usan comúnmente en la industria del bioinsecticida y son bien conocidos por los técnicos en la materias. Estas aplicaciones pueden combinarse con otro pulverizador en aplicaciones de insecticidas (biológicamente basadas u otra) para mejorar la protección de las plantas de las plagas de coleópteros.

Todas las referencias que discuten en este documento, incluyendo publicaciones, patentes y solicitudes de patente, citados en el presente documento, se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la solicitud actual. Nada en el presente documento pretende ser interpretado como una admisión de que los inventores no tienen derecho a antedate tal divulgación en virtud de la invención previa.

Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar ciertos rasgos particulares o los aspectos. Estos

ejemplos no deben interpretarse para limitar la divulgación a las características particulares o los aspectos descritos.

EJEMPLOS

5

Ejemplo 1

Identificación de Genes objetivo candidato

Múltiples etapas de desarrollo de WCR (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) fueron seleccionadas para que el análisis de transcriptoma combinada proporcione una secuencia de genes objetivo candidato para controlar por tecnología de resistencia del insecto de planta transgénica ARNi.

En una ejemplificación, ARN total fue aislado de 0.9 gm de la larva WCR instar primera; (4 a 5 días posteriores a la escotilla; mantenida a 16° C) y purificado mediante el siguiente fenol/TRI REAGENT® basado en método (MOLECULAR RESEARCH CENTER, Cincinnati, OH):

Las larvas se homogeneizaron a temperatura ambiente en un homogeneizador de 15 mL con 10 mL de reactivo de TRI ® hasta obtener una suspensión homogénea. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, el homogeneizado se distribuye en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL (1 mL por tubo), se le adicionó 200 µL de cloroformo y la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Después de permitir la extracción para colocarse a temperatura ambiente durante 10 min, las fases fueron separadas por centrifugación a 12,000 x g a 4°C. La fase superior (compuesto de alrededor de 0.6 mL) fue transferida cuidadosamente en otro tubo

estéril de 1.5 mL y se agregó un volumen igual de temperatura isopropanol. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 5 a 10 min, la mezcla se centrifugó 8 min a 12,000 x g (4° C o ° C 25).

5 El sobrenadante fue quitado cuidadosamente y descartado, y el comprimido del ARN se lavó dos veces con un vórtex con etanol al 75%, con recuperación por centrifugación durante 5 min a 7,500 x g (4°C o 25°C) después de cada lavado. El etanol fue quitado cuidadosamente, el sedimento
10 se permitió al aire seco durante 3 a 5 min y luego fue disuelta en agua estéril libre de nucleasas. La concentración de ARN se determinó mediante la medición de la absorbancia (A) a 260 nm y 280 nm. Una típica extracción de aproximadamente 0.9 gm de larvas rindió más de 1 mg de ARN
15 total, con un cociente A_{260}/A_{280} de 1.9. El ARN así extraído se almacenó a 80° C hasta que se procesó.

La calidad del ARN se determinó mediante la ejecución de una alícuota a través de un gel de agarosa al 1%. La solución de gel de agarosa se realizó mediante
20 autoclave Tampón TAE 10x (acetato de Tris EDTA; 1x concentración es 0.04 M Tris acetato, 1 mM EDTA (etilendiamina tetra acético ácido sodio sal), pH 8.0) diluido con agua DEPC (dietil Pirocarbonato) tratada en un recipiente esterilizado. 1x TAE fue utilizado como el tampón
25 de corriente. Antes de usar, el tanque de la electroforesis y la cavidad formando peine fueron limpiadas con Rnasa AWAY® (INVITROGEN INC., Carlsbad, CA). Dos µL de muestra del ARN

se mezclaron con 8 μ L de tampón TE (10 mM Tris HCl pH 7.0; 1 mM EDTA) y 10 μ L de tampón de muestra de ARN (aislamiento ® Catálogo No 70606; EMD4 Bioscience, Gibbstown, NJ). La muestra fue calentada a 70° C durante 3 min., enfriado a temperatura ambiente, y 5 μ L (contiene 1 μ g de 2 μ g ARN) fueron cargados por pocillo. Los comercialmente disponibles marcadores de peso molecular del ARN se corrieron simultáneamente en pozos separados para la comparación de tamaño molecular. El gel fue correr a 60 voltios durante 2 h.

Una biblioteca de ADNc normalizada se preparó desde el ARN total larvario por un proveedor de servicios comerciales (EUROFINS MWG Operon, Huntsville, AL), usando cebado al azar. La biblioteca de ADNc larval normalizada se secuenció en escala de placa 1/2 por química de series Titanium™ GS FLX 454 en EUROFINS MWG Operon, resultando en más de 600,000 lecturas con una lectura promedio de longitud de 348 bp. 350,000 lecturas fueron ensambladas más 50.000 contigs. Tanto las lecturas desmontadas y los contigs fueron convertidos en bases de datos de BLASTable usando el programa disponible públicamente, FORMATDB (disponible en NCBI).

ARN total y las bibliotecas de ADNc normalizadas igualmente se prepararon materiales cosechados en otras etapas del desarrollo WCR. Se construyó una biblioteca de transcriptoma agrupada para la detección de genes objetivo mediante la combinación de los miembros de la biblioteca de

ADNc que representan las diferentes etapas del desarrollo.

Los genes candidatos para apuntar ARNi fueron seleccionados utilizando información sobre efectos letales ARNi de genes específicos en otros insectos como *Drosophila* y *Tribolium*. Estos genes se presume que son esenciales para la supervivencia y el crecimiento de los insectos de coleópteros. Los homólogos de genes objetivo seleccionados se identificaron en la base de datos de secuencia de transcriptoma como se describe a continuación. La longitud total o secuencias parciales de los genes objetivo fueron amplificadas por PCR para preparar plantillas para la producción de ARN (ARNds) en cadena doble.

Las búsquedas TBLASTN usando secuencias de codificación de proteína candidato se ejecutaron contra las bases de datos BLASTable que contienen las lecturas de secuencia *Diabrotica* desmontadas o los contigs montados. Importantes golpes a una secuencia de *Diabrotica* (definida como mejor que e^{-20} para homologías de contigs y mejor que e^{-10} para las homologías de lecturas de secuencia desmontada) fueron confirmados mediante BLASTX contra la base de datos no redundante de NCBI. Los resultados de esta búsqueda BLASTX confirmaron que las secuencias de *Diabrotica* de genes de candidato homólogo identificados en la búsqueda TBLASTN de hecho abarca genes *Diabrotica*, o fueron el mejor golpeados a la secuencia de genes candidato de no *Diabrotica* presente en las secuencias de *Diabrotica*. En la mayoría de los casos, los genes de candidatos *Tribolium* que fueron anotados como

que codifican una proteína dieron una homología de secuencia sin ambigüedades a una secuencia o secuencias en las secuencias de *Diabrotica* transcriptoma. En algunos casos, era claro que algunos de las lecturas de contigs *Diabrotica* o

5 secuencias no montadas seleccionadas por homología a un gen candidato no *Diabrotica* superpuesto y que el ensamblaje de los contigs no se ha unido a estos traslapes. En esos casos, Sequencher™ v4.9 (GENE CODES CORPORATION, Ann Arbor, MI) fue utilizado para montar las secuencias en contigs más largas.

10 Un gen candidato objetivo que codifica *Diabrotica* rnapII-140 (SEQ ID NO: 1) fue identificado como un gen que puede llevar a la mortalidad de plagas de coleópteros, inhibición del crecimiento, la inhibición del desarrollo o la inhibición de la reproducción en WCR.

15 Genes con homología a WCR rnapII-140

En las tres clases de eucariotes de ARN polimerasas (RNAP) existen: RNAPI, que transcribe el ARN ribosomal; RNAPII, que transcribe todos los genes codificantes de proteínas, y RNAPIII, que transcribe los genes 5S rRNA y

20 tRNA. Estas estructuras complejas constan de 9 a 14 subunidades, algunos de ellos son comunes entre las tres formas de polimerasas en todas las especies, mientras que otros son de clase y especie específica. RNAPII de *Drosophila melanogaster* consiste en al menos 12 subunidades electroforéticamente separables (Kramer y Bautz (1981)

25 European Journal Bioquímica 117: 449 455). Los genes para las dos subunidades más grandes son RpII140 (que codifica una

subunidad de 140 kDa Beta) y RpII215 (que codifica una subunidad de 215 kDa). Ambos genes han demostrado ser esencial para la viabilidad de *Drosophila*, que también es cierto para el gen que codifican una subunidad más pequeña (15-kDa) codificada por RpII15 (Falkenburg et al (1987) *Biología Molecular Diario* 195:. 929-937; Jokerst et al (1989) *Molecular General Genetics* 215:... 266-275; Harrison et al (1992) *Molecular y Biología Celular* 12: 928-935). Otro gen de la subunidad, (RpII18; Hamilton et al (1993) *Genética* 134: 517-529.), Para el que no hay mutaciones conocidas, codifica para una proteína de 18 kDa.

Se describen aquí son secuencias objetivo y efectos letales de RNAi en *Diabrotica virgifera virgifera* RNAPII 140 (subunidad beta).

Los genes con homología a RNAPII 140 proporcionan una agrupación funcional para los objetivos de ARNi. Otras subunidades de RNAPII son también objetivos de ARNi. Transgenes RNAPII dsRNA se pueden combinar con otras moléculas de dsRNA para proporcionar redundante focalización RNAi y los efectos sinérgicos de ARNi. Eventos de maíz transgénicas que expresan dsRNA que se dirige ropRNAPII 140 de producción son útiles para prevenir daño por alimentación de la raíz por gusano de la raíz del maíz. transgenes ropnapII 140 dsRNA representan nuevos modos de acción para combinar con *Bacillus thuringiensis* tecnología proteína insecticida en Manejo de Insectos Resistencia pirámides de genes para mitigar contra el desarrollo de las poblaciones de

gusano de la raíz resistentes a cualquiera de estas tecnologías de control de gusano de la raíz.

La longitud completa o clones parciales de secuencias de un gen candidato *Diabrotica*, RP, se hace referencia en este documento como RNAPII 140, se usaron para generar amplicones de PCR para la síntesis de ARNds.

SEQ ID NO:1 muestra una secuencia 3745 bp DNA de *Diabrotica.rnapII-140*.

SEQ ID NO:3 muestra una secuencia 468 bp DNA de *rnapII* reg1.

SEQ ID NO:4 muestra una secuencia 180 bp DNA de *rnapII* reg2.

SEQ ID NO: 5 muestra una secuencia 161 bp DNA de *vrnapII*

Ejemplo 2

Amplificación de genes objetivo para producir ARNds

Los cebadores fueron diseñados para amplificar las porciones de las regiones de codificación de cada gen objetivo por PCR. Ver tabla 1. Cuando proceda, una secuencia de promotor de fago T7 (TTAATACGACTCACTATAGGGAGA; SEQ ID NO: 6) se incorporó en los extremos 5' de las hebras de sentido amplificado o de antisentidos. Véase tabla 1 El ARN total fue extraído de WCR y la primera cadena ADNc fue utilizada como plantilla para reacciones de PCR usando los cebadores opuestos colocados para amplificar todo o parte de la secuencia del gen objetivo nativo. ARNds también fue

amplificado de un clon de ADN que comprende la región codificante para una proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEQ ID NO: 7; Shagin et al. (2004) *J. Mol. Biol. Evol.* 21 (5) :85841, (50)).

5

Tabla 1. Los cebadores y los pares de cebadores se utilizan para amplificar las porciones de regiones de codificación de gen objetivo de rnapII-140 ejemplar y gen de control negativo de YFP.

10

	Id. del Gen	Id. del cebador	SEQ ID NO:	Secuencia
15	Par 1 <i>rnapII reg1</i>	RNAPreg1-F1T 7	8	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCTA CCCATTGGGAGAAAGAC
		RNAPreg1-R1T 7	9	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCA GCTTTTTTGTGGCC
20	Par 2 <i>rnapII reg2</i>	RNAPreg2-F1T 7	10	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAAAT AAGAGACTCGATTTGGCTG
		RNAPreg2-R1T 7	11	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCG AGAGAATACCTCAGACC
25	Par 3 <i>rnapII reg3</i>	RNAPreg3-F2T 7	12	TTAATACGACTCACTATAGGGAGATTCT GCAGTAGAAAGAGGATTTTC
		RNAPreg3-R2T 7	13	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCG TCGTCTAATTTATCGTAAAGG
25	Par 4 YFP	YFP-F_T7	14	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAcacca tgggctccagcggcgccc
		YFP-R_T7	15	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAagatc ttgaaggcgtcttcagg

Ejemplo 3Construcciones ARNiPreparación de plantilla por síntesis PCR y ARNds

5 Una estrategia utilizada para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNds YFP y rnapII-140 se muestra en la FIG. 1. La plantilla ADN destinada al uso en la síntesis rnapII-140 ARNds fueron preparados por PCR utilizando los pares del cebador en la

10 tabla 1 y (como plantilla de PCR) primera hebra ADNc preparada a partir de ARN total aislado de las larvas instar primeras WCR. (YFP fue amplificado de un clon ADN de una región de codificación YFP). Para cada seleccionado rnapII-140 y región de gen YFP objetivo, las amplificaciones

15 de PCR introdujeron una secuencia promotora T7 en los extremos 5' de las hebras de sentido amplificado y de antisentidos. Los dos fragmentos PCR amplificados para cada región del los genes objetivo se mezclaron por consiguiente en cantidades aproximadamente iguales y la mezcla se utilizó

20 como plantilla de transcripción para la producción de ARNds. (Ver fig. 1. Las secuencias de las plantillas de ARNds amplificadas con los pares de cebador particular fueron: SEQ ID NO: 3 (reg1 rnapII), SEQ ID NO: 4 (reg2 rnapII), SEQ ID NO: 5 (reg3 rnapII) y YFP (SEQ ID NO: 7). ARN doble en

25 cadena para insecto bioensayo fue sintetizada y purificado usando un equipo de AMBION® MEGASCRIP® ARNi siguiendo las instrucciones del fabricante (INVITROGEN). Se midieron las

concentraciones de ARNds usando un espectrofotómetro NANODROP® 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE).

Construcción de vectores de transformación de plantas

5 Los Vectores de entrada (pDAB115762 y pDAB115763) albergando un constructo gen objetivo para la formación de la horquilla que abarca segmentos de rnapII-140 (SEQ ID NO: 1) fueron ensamblados utilizando una combinación de fragmentos sintetizados químicamente (DNA2.0, Menlo Park, CA) y métodos

10 de clonación moleculares estándar. La formación de horquilla intramolecular por transcripciones primarias ARN fue facilitada por el arreglo (dentro de una unidad de transcripción simple) dos copias de un segmento de gen objetivo en orientación opuesta uno al otro, los dos

15 segmentos están separados por una secuencia de intrón ST LS1 (SEQ ID NO: 19; Vancanneyt et al. (1990) *J. Mol. Gen. Genet.* 220 (2) :85245, (50)). Por lo tanto, la transcripción de ARNm primario contiene las dos secuencias de segmento de genes rnapII-140 como repeticiones invertidas grandes uno del

20 otro, separados por la secuencia del intrón. Una copia de un promotor de ubiquitina maíz 1 (US patente N° 5.510.474) fue utilizada para conducir la producción de la transcripción de horquilla ARNm primaria y un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen de maíz peroxidasa 5 (ZmPer5

25 3' UTR v2; US patente N° 6.699.984) fue utilizado para terminar la transcripción de la horquillaARN que expresa el gen.

El vector de entrada PDAB115762 se compone de un constructo de horquilla ARN de rnapII-140 (SEQ ID NO: 16) que se compone de un segmento de rnapII-140 (SEQ ID NO: 1)

El vector de entrada PDAB115763 se comprende de un constructo de horquilla ARN (SEQ ID NO: 17) que se compone de un segmento de rnapII-140 (SEQ ID NO: 1) distinto del que se encuentra en pDAB115762.

Los vectores de entrada pDAB115762 y pDAB115763 descritos anteriormente fueron utilizados en reacciones de recombinación de GATEWAY® estándar con un vector típico destino binario (pDAB109805) para producir vectores de transformación la expresión de horquilla ARN para *Agrobacterium* mediada por las transformaciones de maíz embrión (pDAB114524 y pDAB114525), respectivamente).

Un vector binario de control negativo, pDAB110853, que comprende un gen que expresa un YFP horquilla ARNs, se construyó mediante recombinación GATEWAY® estándar reacciones con un vector típico destino binario (pDAB109805) y la entrada del vector pDAB101670. El vector de entrada PDAB101670 consta de una secuencia de horquilla YFP (SEQ ID NO: 18) bajo el control de la expresión de un promotor de ubiquitina maíz 1 (como el anterior) y un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen de maíz peroxidasa 5 (como arriba).

El vector binario PDAB109805 destino se compone de un gen de resistencia a herbicidas (aryloxyalkanoate dioxygenase; AAD-1 v3) (US patente N° 7838733(B2) y Wright et

al. Proc. Natl. Acad. Sci. ESTADOS UNIDOS 107:20240-5) bajo la regulación de un promotor fuerte de caña de azúcar baciliforme badnavirus (ScBV) (Schenk et al. (1999) planta Molec. Biol. 39:1221-30. Una secuencia sintética 5' UTR
 5 compuesta por secuencias de un gen de la proteína de maíz Streak Virus (MSV) capa 5' UTR e intrón 6 de un maíz gen 1 de alcohol deshidrogenasa (ADH1), se coloca entre el extremo 3' del segmento SCBV promotor y el codón de inicio de la región codificante de la AAD-1. Un fragmento que comprende una
 10 región 3' no traducida de un gen de la lipasa maíz (ZmLip 3' UTR; US patente N° 7.179.902) se utiliza para terminar transcripción del ARNm AAD-1.

Un vector binario de control negativo adicional, pDAB110556, que comprende un gen que expresa una proteína
 15 YFP, se construyó mediante recombinación GATEWAY® estándar reacciona con un vector típico destino binario (pDAB9989) y la entrada del vector pDAB100287. El vector de destino binario PDAB9989 se compone de un gen de resistencia a herbicidas (aryloxyalkanoate dioxygenase; AAD 1 v3) (como
 20 arriba) bajo la regulación de la expresión de un promotor de ubiquitina maíz 1 (como el anterior) y un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen de la lipasa maíz (ZmLip 3' UTR; como arriba). El vector de entrada PDAB100287 comprende una región de codificación YFP (SEQ ID
 25 NO: 20) bajo el control de la expresión de un promotor de ubiquitina de maíz 1 (como el anterior) y un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen de peroxidasa

de maíz 5 (como arriba).

SEQ ID NO: 16 presenta un rnapII-140 de secuencia de versión 1 formadora de ARN de horquilla de *Diabrotica virgifera* como se encuentra en pDAB114524.

5 SEQ ID NO: 17 presenta un rnapII-140 de secuencia de versión 2 formadora de ARN de horquilla de *Diabrotica virgifera* como se encuentra en pDAB114525.

Ejemplo 4

10 Bioensayos de Dieta de Insectos

Preparación de muestra y bioensayos.

Un número de de moléculas ARNds (los correspondientes a reg1 rnapII incluidos (SEQ ID NO: 3), rnapII reg2 (SEQ ID NO: 4) y reg 3 rnapII (SEQ ID NO: 115) se
15 sintetizaron y purificaron usando un equipo de MEGASCRIP[®] ARNi. Las moléculas ARNds purificadas se prepararon en el tampón TE, y todas los bioensayos contuvieron un tratamiento de control que consiste en este tampón, el cual sirvió como una verificación de antecedentes para la inhibición de
20 mortalidad o el crecimiento de WCR (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Se midieron las concentraciones de las moléculas ARNds en el tampón de bioensayo usando un espectrofotómetro NANODROP[®] 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE).

25 Las muestras fueron probadas para la actividad de los insectos en las pruebas biológicas realizadas con larvas de insecto recién nacido en dieta artificial de insectos.

Los huevos WCR se obtuvieron de CROP CHARACTERISTICS, INC. (Farmington, MN).

Los bioensayos se realizaron en 128 bandejas de plástico de pocillo diseñadas específicamente para los bioensayos de insectos (CD INTERNATIONAL, Pitman, NJ). Cada pocillo contenido aproximadamente 1.0 mL de una dieta artificial diseñada para el crecimiento de los insectos de coleópteros. Una alícuota de 60 μ L de muestra de ARNds fue entregada con la pipeta sobre la superficie de la dieta de cada pocillo (40 μ L/cm²). Se calcularon las concentraciones de muestra ARNds como la cantidad de ARNds por centímetro cuadrado (ng/cm²) de superficie (1,5 cm²) en el pozo. Las bandejas tratadas se llevaron a cabo en una campana de humos hasta que el líquido en la superficie de la dieta se evaporó o fueron absorbidos por la dieta.

Dentro de unas horas de la eclosión, las larvas individuales fueron recogidas con un cepillo de pelo de camello humedecido y depositadas sobre la dieta tratada (uno o dos larvas por pocillo). Los pozos infestados de las bandejas de plástico de pocillo 128 fueron sellados con hojas adhesivas de plástico transparente y ventilados para permitir el intercambio gaseoso. Las bandejas de bioensayo se llevaron a cabo en condiciones ambientales controladas (28° C, ~ 40% de humedad relativa, 16:8 (luz:oscuridad)) durante 9 días, después de que el número total de insectos expuestos a cada muestra, el número de insectos muertos y el peso de sobrevivir el tiempo los insectos se registraron. La

mortalidad por ciento promedio y la inhibición del crecimiento promedio se calculan para cada tratamiento. La Inhibición del crecimiento (GI) se calculó de la siguiente manera:

$$5 \quad GI = [1 - (TWIT/TNIT)/(TWIBC/TNIBC)]$$

donde TWIT es el peso Total de insectos vivos en el tratamiento;

TNIT es el número Total de insectos en el tratamiento;

10 TWIBC es el peso Total de insectos vivos en el Background Check (control del tampón); y

TNIBC es el número Total de insectos en la Verificación del Antecedente (control del tampón).

El análisis estadístico se realizó mediante el software JMP ® (SAS, Cary, NC).

15 CL₅₀ (concentración letal) se define como la dosis que 50% de los insectos de prueba son asesinados. GI₅₀ (inhibición del crecimiento) se define como la dosis en el cual el crecimiento (e.g. de peso vivo) de los insectos de prueba es el 50% del valor promedio visto en muestras de antecedentes.

20 Los bioensayos replicadas demostraron que la ingestión de muestras particulares resultó en una sorprendente e inesperada de la mortalidad y la inhibición del crecimiento de las larvas de gusano de la raíz de maíz.

Detección de genes objetivo candidato

ARNds sintético diseñado para inhibir las secuencias de genes objetivo identificadas en el ejemplo 1 causa inhibición de crecimiento y mortalidad cuando se administra a WCR en ensayos de dieta basada. reg1 rnapII, reg2 rnapII y reg3 rnapII se observaron a exhibir mayor eficacia en este ensayo sobre otros ARNds proyectado.

Los Bioensayos replicados demostraron la ingestión de ARNds preparados derivados de reg1 rnapII, reg2 rnapII y reg3 rnapII que cada uno dio lugar a la inhibición de la mortalidad y crecimiento de larvas crisomela del maíz. La tabla 2 y tabla 3 muestran los resultados de los bioensayos de alimentación basada en dieta de larvas WCR después de la exposición de 9 días a estos ARNds, así como los resultados obtenidos con una muestra de control negativo de ARNds preparados a partir de una región de codificación proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEQ ID NO: 7).

Tabla 2. Resultados de rnapII-140 ARNds dieta alimentación ensayos obtenidos con las larvas de crisomela del maíz después de 9 días de alimentación. El análisis ANOVA encontraron diferencias de significación en promedio de % de mortalidad y promedio de % de inhibición de crecimiento (GI). Los medios fueron separados mediante la prueba de Tukey Kramer.

Nombre del Gen	Dosis (ng/cm ²)	No. de Filas	Medio % Mortalidad ± SEM*	Medio GI ± SEM
RNAPII reg1	500	4	97.06 ± 1.70 A	0.99 ± 0.00 A
RNAPII reg2	500	10	85.23 ± 2.97 A	0.94 ± 0.02 A
RNAPII reg3	500	10	89.35 ± 3.00 A	0.97 ± 0.02 A
TampónTE	0	12	7.27 ± 4.17 B	0.01 ± 0.04 B
AGUA	0	13	5.81 ± 2.11 B	0.01 ± 0.03 B
YFP	500	10	4.90 ± 1.80 B	-0.08 ± 0.18 B

*SEM = Error Estándar del Medio. Las letras en paréntesis designan los niveles estadísticos. Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferente (P<0.05).

**TE = Tris HCl (10 mM) más tampón EDTA (1 mM), pH8.

***YFP = Proteína Fluorescente Amarilla

Tabla 3. Resumen de potencia oral de rnapII-140 ARNds sobre larvas de circulante (ng/cm²).

Nombre de la Muestra	LC ₅₀	LC ₅₀ Rango	GI ₅₀	GI ₅₀ Rango
RNAPII reg1	103.65	68.4-167.26	20.49	11.64-36.06
RNAPII reg2	6.71	4.37-9.83	4.29	1.76-10.45
RNAPII reg3	2.72	1.72-4.01	1.30	0.75-2.27

Se ha sugerido previamente que ciertos genes de

Diabrotica spp pueden explotarse para control de insectos de ARNi mediado. Ver Estados Unidos patentes publicación N° 2007/0124836, que revela las 906 secuencias, y Estados Unidos patente N° 7,612,194, que revela las 9,112 secuencias. Sin embargo, se determinó que muchos genes sugeridos tener utilidad para ARNi había mediado control de insectos no son eficaces en el control de Diabrotica. También se determinó que las secuencias reg1 rnapII, reg2 rnapII y reg3 rnapII proporcionan sorprendente e inesperado control superior de Diabrotica, en comparación con otros genes sugirió tener utilidad para ARNi mediado control de insectos.

Por ejemplo, anexina, spectrin Beta 2 y mTRP L4 eran cada uno sugirió en US patente N° 7,612,194 ser eficaz en ARNi mediado control de insectos. SEQ ID NO: 21 es la secuencia del ADN de la región de Anexina 1 (Reg1). SEQ ID NO: 22 es la secuencia de ADN de Anexina región 2 (Reg 2) y SEQ ID NO: 23 es la secuencia de ADN de Beta espectralina 2 región 1 (Reg 1), y SEQ ID NO: 24 es la secuencia ADN de Beta espectralina 2 región 2 (Reg2). SEQ ID NO: 25 es la secuencia ADN de mTRP-L4 región 1 (Reg 1), y SEQ ID NO: 26 es la secuencia ADN de mTRP L4 región 2 (2 Reg). Una secuencia YFP (SEQ ID NO: 7) también fue utilizada para producir ARNs como control negativo.

Cada una de las secuencias antes mencionadas se utilizó para producir ARNs por los métodos del ejemplo 3. La estrategia utilizada para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNs se muestra en la

figura. 2. La Plantilla ADNs destinada a utilizarse en la síntesis de ARNds se prepararon mediante PCR utilizando los pares del cebador en la tabla 4 y (como plantilla de PCR) primera hebra ADNc preparada a partir de ARN total aislado de larvas instar primeras WCR. (YFP fue amplificada de un clon de ADN). Para cada región del gen objetivo seleccionado, se realizaron dos separadas amplificaciones de PCR. La amplificación PCR primera introdujo una secuencia promotora T7 en el extremo 5' de las hebras de sentido amplificado. La segunda reacción incorporó la secuencia promotora T7 en los extremos 5' de las hebras de antisentidos. Los dos fragmentos PCR amplificados para cada región del los genes objetivo se mezclaron por consiguiente en cantidades aproximadamente iguales y la mezcla se utilizó como plantilla de transcripción para la producción de ARNds. (Ver fig. 2. ARN en cadena doble fue sintetizado y purificado usando un equipo de AMBION ® MEGAscript ® ARNi siguiendo las instrucciones del fabricante (INVITROGEN). Se midieron las concentraciones de ARNds usando un espectrofotómetro NANODROP ® 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE). y cada uno los ARNds fueron probados por los mismos métodos de bioensayo dieta basada descritos anteriormente. La tabla 4 muestra las secuencias de los cebadores usados para producir la anexina Reg1, Reg2 anexina, spectrin Beta 2 Reg1, spectrin Beta 2 Reg2, mtRP Reg1 L4 y las moléculas ARNds mtRP Reg2 L4. Secuencias de cebador YFP para utilizan en el método representado en la figura. 2. también aparecen en la tabla 4.

Tabla 5 presenta los resultados de las pruebas biológicas de alimentación de larvas WCR después de la exposición de 9 días a estas moléculas ARNds dieta basada. Los bioensayos replicados demostraron que la ingestión de estos ARNds dio lugar a ninguna inhibición de mortalidad o de crecimiento de las larvas de crisomela del maíz por encima de lo visto con las muestras de control del tampón TE, Agua o proteína YFP.

Tabla 4. Cebadores y Pares de Cebador utilizan para amplificar las porciones de la codificación de las regiones de los genes.

15

20

25

5		Gen (Región)	Id. del cebador	SEQ ID NO:	Secuencia
	Par 5	Anexina (Reg 1)	Ann-F1_T7	27	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCT CCAACAGTGGTTCCTTATC
10		Anexina (Reg 1)	Ann-R1	28	CTAATAATTCTTTTTTAATGTTCTGAG G
	Par 6	Anexina (Reg 1)	Ann-F1	29	GCTCCAACAGTGGTTCCTTATC
15		Anexina (Reg 1)	Ann-R1_T7	30	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTA ATAATTCTTTTTTAATGTTCTGAGG
	Par 7	Anexina (Reg 2)	Ann-F2_T7	31	TTAATACGACTCACTATAGGGAGATTG TTACAAGCTGGAGAACTTCTC
20		Anexina (Reg 2)	Ann-R2	32	CTTAACCAACAACGGCTAATAAGG
	Par 8	Anexina (Reg 2)	Ann-F2	33	TTGTTACAAGCTGGAGAACTTCTC
25		Anexina	Ann-R2T7	34	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTT AACCAACAACGGCTAATAAGG

	Gen (Región)	Id. del cebador	SEQ ID NO:	Secuencia
	(Reg 2)			
5	Beta-espec t2 (Reg 1)	Betasp2-F1_T7	35	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGA TGTTGGCTGCATCTAGAGAA
	Beta-espec t2 (Reg 1)	Betasp2-R1	36	GTCCATTCTGTCATCCACTGCA
10	Beta-espec t2 (Reg 1)	Betasp2-F1	37	AGATGTTGGCTGCATCTAGAGAA
	Beta-espec t2 (Reg 1)	Betasp2-R1_T7	38	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTC CATTCTGTCATCCACTGCA
15	Beta-espec t2 (Reg 2)	Betasp2-F2_T7	39	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCA GATGAACACCAGCGAGAAA
	Beta-espec t2 (Reg 2)	Betasp2-R2	40	CTGGGCAGCTTCTTGTTTCCTC
20	Beta-espec t2 (Reg 2)	Betasp2-F2	41	GCAGATGAACACCAGCGAGAAA
	Beta-espec t2 (Reg 2)	Betasp2-R2_T7	42	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTG GGCAGCTTCTTGTTTCCTC
25				

5		Gen (Región)	Id. del cebador	SEQ ID NO:	Secuencia
	Par 13	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-F1_T7	43	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGT GAAATGTTAGCAAATATAACATCC
mtRP-L4 (Reg 1)		L4-R1	44	ACCTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG	
10	Par 14	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-F1	45	AGTGAAATGTTAGCAAATATAACATCC
		mtRP-L4 (Reg 1)	L4-R1_T7	46	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAACCTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG
15	Par 15	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-F2_T7	47	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAGTCAAGATTTGAAGTGAGAGGT
		mtRP-L4 (Reg 2)	L4-R2	48	CTACAAATAAAACAAGAAGGACCCC
20	Par 16	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-F2	49	CAAAGTCAAGATTTGAAGTGAGAGGT
		mtRP-L4 (Reg 2)	L4-R2_T7	50	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTACAAATAAAACAAGAAGGACCCC

Tabla 5. Resultados de los ensayos de alimentación de dieta obtenidos con las larvas de crisomela del maíz después de 9 días.

Nombre del Gen	Dosis (ng/cm ²)	Medio vivo Peso Larval (mg)	Medio % Mortalidad	Inhibición del crecimiento del medio
Anaxina-Reg 1	1000	0.545	0	-0.262
Anaxina-Reg 2	1000	0.565	0	-0.301
Beta espectralina2 Reg 1	1000	0.340	12	-0.014
Beta espectralina2 Reg 2	1000	0.465	18	-0.367
mtRP-L4 Reg 1	1000	0.305	4	-0.168
mtRP-L4 Reg 2	1000	0.305	7	-0.180
Tampón TE*	0	0.430	13	0.000
Agua	0	0.535	12	0.000
YFP**	1000	0.480	9	-0.386

*TE = Tris HCl (10 mM) más tampón EDTA (1 mM), pH8.

**YFP = Proteína Fluorescente Amarilla

Ejemplo 6

Producción de tejidos de maíz transgénico que comprende horquilla de insecticidas ARNds

Transformación mediada por Agrobacterium

Las células de maíz transgénicas, tejidos y las plantas que producen una o más moléculas ARNds de insecticida (por ejemplo, al menos una molécula ARNds incluyendo una molécula de ARNds apuntando a un gen que comprende rnapII-140; SEQ ID NO: 1) a través de la expresión de un gen

quimérico estable integrado en la planta de genoma se produjeron tras la transformación mediada por *Agrobacterium*. Los Métodos de transformación maíz empleando vectores de transformación binaria o superbinary son conocidos en el arte, como se describe, por ejemplo, en Estados Unidos patente N° 8.304.604. Los tejidos transformados fueron seleccionados por su capacidad de crecer en medio que contengan Haloxifop y fueron examinados para la producción de ARNds, según corresponda. Las porciones de dichos cultivos de tejidos transformados podrán presentarse a las larvas de gusano de la raíz de maíz recién nacido por bioensayos, esencialmente como se describe en el ejemplo 1.

Iniciación de cultivo de *Agrobacterium*. Las concentraciones de glicerol de células cepa DAt13192 de *Agrobacterium* (WO 2012/016222A2) albergando una transformación binaria vector pDAB114524, pDAB114525, pDAB110853 o pDAB110556 descrito anteriormente (ejemplo 4) fueron veteados en placas de medio mínimas de AB (Watson, et al., (1975) J. Bacteriol. 123:255-264) que contienen antibióticos apropiados y fueron cultivadas a 20 ° C durante 3 días. Los cultivos fueron entonces rayados en las placas YEP (gm/L: Extracto de levadura, 10; Peptona, 10; NaCl 5) que contiene los mismos antibióticos y se incubaron a 20 ° C durante 1 día.

Cultivo de *Agrobacterium*. En el día de un experimento, una solución de concentrado de medio de inoculación y acetosiringona se preparó en un volumen

adecuado a la cantidad de construcciones en el experimento y pipetea en un matraz de 250 mL estéril, desechable. Medio de inoculación (Frame et al. (2011) Transformación Genérica que usa Embriones Cigóticos Inmaduros de Maíz. Protocolos y métodos de cultivo de embrión de planta en: Métodos en biología molecular T. Thorpe A. y E. C. Yeung, (Eds.), Springer ciencia y negocios Media, LLC. PP 327-341) contiene: 5 gm 2,2/L MS sales; 1 X ISU modificados MS vitaminas (marco et al., ibid.) sacarosa 68,4 gm/L; glucosa 36 gm/L; prolina 115 mg/L L; e inositol myo 100 mg/L; a pH 5.4). Acetosiringona fue agregada al matraz que contiene medio de inoculación a una concentración final de 200 μ M de una solución de concentrado de 1 M en 100% dimetil sulfóxido y la solución se mezcla bien.

15 Para cada construcción, 1 o 2 lleno de Agrobacterium de la placa de YEP para inoculación fueron suspendidos en 15 mL de la solución madre de inoculación medio/acetosiringona en un estéril, desechable, tubo de centrífuga de 50 mL y la densidad óptica de la solución a 550 nm (OD₅₅₀) se midió en un espectrofotómetro. La suspensión se diluyó luego a OD₅₅₀ de 0.3 a 0.4 mediante mezcla de inoculación medio/acetosiringona adicional. El tubo de suspensión Agrobacterium fue entonces colocado horizontalmente en un agitador de plataforma en 20 aproximadamente 75 rpm a temperatura ambiente y sacudido por 25 1 a 4 horas mientras se realizó la disección del embrión.

Esterilización del oído y embrión aislamiento. Los

embriones inmaduros de maíz se obtuvieron plantas de línea consanguínea de Zea mays B104 (Hallauer y cols. (1997) crop Science 37:1405 1406) cultivados en el invernadero y sí mismo o sib polinizada para producir las orejas. Los oídos se cosecharon aproximadamente 10 a 12 días post polinización. En la jornada experimental, de descascarillado orejas fueron esterilizada por inmersión en una solución al 20% de lejía comercial la superficie (ULTRA CLOROX ® germicida Bleach, 6.15% hipoclorito de sodio; con dos gotas de TWEEN 20) y se agitó durante 20 a 30 min, seguido de tres enjuagues en agua desionizada estéril en una campana de flujo laminar. Los embriones cigóticos inmaduros (1.8 a 2.2 mm de largo) fueron asépticamente disecados de cada oreja y distribuidos al azar en los tubos de microcentrífuga con 2.0 mL de una suspensión de células adecuadas Agrobacterium en medio líquido de inoculación con 200 µM acetosiringona, en cual 2 µL de 10% BREAK THRU ® S233 surfactante (EVONIK INDUSTRIES; Había añadido Essen, Alemania). Para un determinado conjunto de experimentos, embriones de oídos combinados fueron utilizados para cada transformación.

Co-Cultivo de Agrobacterium. Después de aislamiento, los embriones fueron colocados en una plataforma oscilante durante 5 minutos. El contenido del tubo luego se vierte sobre una placa de cultivo Co medio, que contenía 4,33 gm/L que MS sales; 1 X ISU modificados MS vitaminas; sacarosa 30 gm/L; prolina 700 mg/L L; 3,3 mg/L Dicamba en KOH (3,6 dicloro o ácido anísico o 3,6 dicloro 2 metoxibenzoico

ácido); inositol myo 100 mg/L; Hidrolizado enzimático de la caseína de 100 mg/L; AgNO₃ 15 mg/L; Acetosiringona 200 µM en DMSO; y 3 gm/L GELZAN TM, a pH 5.8. Con una pipeta estéril, desechable, fue quitada la suspensión líquida de Agrobacterium. Los embriones fueron entonces orientado con el escutelo hacia arriba usando pinzas estériles con la ayuda de un microscopio. La placa fue cerrada, sellada con cinta adhesiva médica 3M MICROPORE ® y colocada en una incubadora a 25° C con luz continua en aproximadamente 60 µmol m⁻²s⁻¹ de radiación fotosintéticamente activa radiación (PAR).

Selección de callos y regeneración de eventos transgénicos. Después del período de co-cultivo, los embriones fueron transferidos al medio de descanso, que fue compuesta de 4,33 gm/L que MS sales; 1 X ISU modificados MS vitaminas; sacarosa 30 gm/L; prolina 700 mg/L L; Dicamba 3,3 mg/L en KOH; inositol myo 100 mg/L; Hidrolizado enzimático de la caseína de 100 mg/L; AgNO₃ 15 mg/L; gm 0,5/L MES (2 (N Morfolino) etanesulfónico monohidrato; PHYTOTECNOLOGIES L.; Lenexa, KS); Carbenicilina 250 mg/L; y 2,3 gm/L GELZAN TM; a pH 5.8. No más de 36 embriones fueron trasladados a cada plato. Las placas fueron colocadas en una caja de plástico transparente y se incubó a 27° C con luz continua en aproximadamente 50 µmol m⁻²s⁻¹ PAR de 7 a 10 días. Callosas embriones fueron transferidos luego (< 18/placa) en medio de selección I, el cual estaba compuesto por medio de reclinación (arriba) con ácido de R Haloxifop de 100 nM (0,0362 mg/L; para selección de calli albergando el gen AAD-

1). Las placas se volvieron a desactivar las casillas y se incubaron a 27° C con luz continua en aproximadamente 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR por 7 días. Callosas embriones fueron transferidos luego (< 12/placa) a la selección media II, que se compone de medio descansando (arriba) con ácido de R Haloxifop de 500 nM (0.181 mg/L). Las placas se volvieron a desactivar las casillas y se incubaron a 27° C con luz continua en aproximadamente 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR por 14 días. Este paso de selección permite transgénico callo proliferar y diferenciarse.

Proliferando, callos embriogénicos fueron transferidos (< 9/placa) a medio de Pre regeneración. La pre regeneración medio contuvo 4,33 gm/L que MS sales; 1 X ISU modificados MS vitaminas; sacarosa 45 gm/L; prolina 350 mg/L; inositol myo 100 mg/L; Hidrolizado enzimático de la caseína de 50 mg/L; AgNO₃ 1,0 mg/L; gm 0,25/L MES; 0,5 mg/L de ácido naftalenacético en NaOH; 2,5 mg/L de ácido abscísico en etanol; 1 mg/L 6 bencilaminopurina; Carbenicilina 250 mg/L; 2,5 gm/L GELZAN TM; y 0,181 mg/L ácido Haloxifop; a pH 5.8. Las placas fueron guardadas en cajas claras y se incubó a 27° C con luz continua en aproximadamente 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR por 7 días. La regeneración calli luego fueron transferidas (< 6/placa) en medio de la regeneración en PHYTATRAYS TM (SIGMA ALDRICH) y se incubaron a 28° C con 16 horas luz/8 horas por día oscuros (a aproximadamente 160 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) durante 14 días o hasta que los brotes y raíces desarrolladas. La regeneración medio contuvo 4.33 gm/L que

MS sales; 1 X ISU modificados MS vitaminas; sacarosa 60 gm/L; inositol myo 100 mg/L; Carbenicilina 125 mg/L; 3 gm/L GELLAN[™] de las encías; y 0.181 mg/L R Haloxifop ácido; a pH 5.8. Los pequeños brotes con raíces primarias fueron aislados y transferidos al medio de alargamiento sin selección. El alargamiento medio contenía 4,33 gm/L que MS sales; 1 X ISU modificados MS vitaminas; sacarosa 30 gm/L; y 3,5 gm/L GELRITE ®: a pH 5.8.

Los brotes de la planta transformada seleccionados por su capacidad de crecer en medio que contiene Haloxifop fueron trasplantados de PHYTATRAYS[™] para botes pequeños llenados de crecimiento medio (PROMIX BX; PREMIER TECH HORTICULTURE), cubierto con tazas o HUMI domos (ARCO plásticos) y luego endurecidos apagado en una cámara de crecimiento CONVIRON (27 ° C día/24 ° C noche, fotoperíodo de 16 horas, 50-70% RH, 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR). En algunos casos, las plántulas transgénicas putativas fueron analizadas para número de copia relativa transgén por análisis PCR de tiempo real cuantitativo utilizando cebadores diseñados para detectar el gen de la tolerancia del herbicida AAD1 integrado en el genoma del maíz. Además, ARN qPCR ensayos fueron utilizados para detectar la presencia de la secuencia del intrón ST-LS1 en ARNds expresa de putativo transformantes. Las plántulas transformadas seleccionadas fueron trasladadas luego en un invernadero para crecimiento y pruebas.

Transferencia y establecimiento de plantas T₀ en el invernadero para la producción de bioensayo y semillas

Cuando las plantas alcanzaron la etapa V3-V4, fueron trasplantados en la mezcla de suelo IE CUSTOM BLEND (perfil/METRO mezclar 160) y crecidos hasta la floración en el invernadero (tipo de exposición de luz: Foto o asimilación; Alto límite ligero: 1200 PAR; La duración del día 16 horas; 27 ° C día / 24 ° C la noche).

Las plantas que se utilizará para bioensayos insectos fueron trasplantadas desde botes pequeños TINUS TM 350-4 ROOTRAINERS [®] (SPENCER LEMAIRE INDUSTRIES, Acheson, Alberta, Canadá;) (una planta por evento y por ROOTRAINER [®]). Aproximadamente cuatro días después del transplante a ROOTRAINERS [®], se infestaron plantas por bioensayos.

Se obtuvieron plantas de la generación del T₁ de polinizar las sedas de plantas transgénicas con polen recogidas en las plantas de la línea consanguínea elite no transgénica B104 u otros donantes adecuados polen T₀ y plantando las semillas resultantes. Se realizaron cruces recíprocos cuando sea posible.

20

Ejemplo 7

Análisis moleculares de los tejidos de maíz transgénicos

Análisis molecular (ej.: ARN qPCR) de maíz los tejidos fueron realizados sobre muestras de hojas y raíces que se recolectaron de invernadero cultivada plantas en los mismos días se evaluó que la raíz de daños de la alimentación.

25

Los resultados de ensayos de qPCR ARN para el Per5 3' UTR se utilizaron para validar la expresión de los transgenes de horquilla. (Un bajo nivel de detección de Per5 3' UTR se espera en las plantas de maíz nontransformed, puesto que generalmente no hay expresión del gen en tejidos maíz Per5 endógeno). Resultados de ensayos de qPCR ARN para la secuencia de intrón de LS1 ST (que es parte integral de la formación de moléculas ARNds horquilla) en expresadas RNAs utilizaron para validar la presencia de transcripciones de horquilla. Se midieron niveles de expresión del transgén ARN en relación con los niveles de ARN de un gen endógeno de maíz.

El análisis de qPCR de ADN para detectar una porción de la región codificante de AAD1 en la ADN genomic fueron utilizados para estimar el número de copias de inserción transgénica. Se recolectaron muestras para los análisis de plantas cultivadas en compartimientos ambientales. Los resultados fueron comparados con resultados de ADN qPCR de ensayos diseñados para detectar una porción de un gen nativo de copia única y simples eventos (con uno o dos ejemplares de los transgenes) fueron avanzados para estudios posteriores en el invernadero.

Además, qPCR ensayos diseñados para detectar una porción del gen de resistencia espectinomicina (SpecR; albergaba en los plásmidos de vector binario fuera el ADN T) fueron utilizadas para determinar si las plantas transgénicas contienen extraños plásmido integrado secuencias de columna

vertebral.

Nivel de expresión de transcripción de horquilla

ARN: por 5 3' UTR qPCR

Eventos de la célula del callo o las plantas transgénicas se analizaron por tiempo real PCR cuantitativa (qPCR) del Por 5 3' UTR secuencia de determinar el nivel de la expresión relativa de la transcripción de la horquilla de longitud total, en comparación con el nivel de transcripción de un gen de maíz interno (SEQ ID NO: 51; GENBANK ® no adhesión. BT069734), que codifica un TIP41 como proteína (es decir un homólogo del maíz de GENBANK ® no adhesión. AT4G34270; con una puntuación de tBLASTX de identidad del 74%). ARN fue aislado usando un equipo de 96 RNAEASY™ (QIAGEN, Valencia, CA). La siguiente de elución, el ARN total fue sometido a un tratamiento de DNase1 según protocolo sugerido del equipo. Luego se cuantificó el ARN en un espectrofotómetro NANODROP® 8000 (THERMO SCIENTIFIC) y concentración fue normalizada a 25 ng/µL. La primera hebra ADNc se preparó utilizando un ADNc de alta capacidad síntesis equipo (INVITROGEN) en un volumen de reacción de 10 µL con 5 µL desnaturalizado ARN, sustancialmente según protocolo recomendado del fabricante. El protocolo se modificó ligeramente para incluir la adición de 10µL de 100 µM T20VN oligonucleotido (IDT) (SEQ ID NO:52; TTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN, donde V es A, C, o G y N es A, C, G, o T/U) en el tubo de 1mL de la mezcla madre, con el fin de preparar una cepa de trabajo de cebadores aleatorios combinados y oligo dT.

Tras la síntesis de ADNc, muestras fueron diluidas 1:3 con agua libre de nucleasas y almacenaron a -20° C hasta que se ensayaron.

El tiempo real separado PCR ensayos para la Per5 3' UTR y TIP41 como transcripción se realizaron en un LIGHTCYCLER® 480 (ROCHE DIAGNOSTICS, Indianapolis, IN) en 10 volúmenes de reacción µL. Para el Per5 3' ensayo UTR, las reacciones fueron funcionadas con cebadores P5U76S (F) (SEQ ID NO: 53) y P5U76A (R) (SEQ ID NO: 54) y una sonda UNIVERSAL ROCHE™ (UPL76; Catálogo no. 4889960001; Etiquetado con FAM). Para los TIP41 como ensayo de referencia genética, cebadores TIPmxF (SEQ ID NO: 55) y TIPmXR (SEQ ID NO: 56) y Sonda HXTIP (SEQ ID NO: 57) marcados con HEX (hexaclorofluoresceína) fueron utilizados.

Todos los ensayos incluyeron controles negativos de ninguna plantilla (sólo mezcla). Para las curvas estándar, un espacio en blanco (agua del pocillo de fuente) también fue incluido en la placa de la fuente para verificar la contaminación de la cruzada de la muestra. Imprimación y secuencias de sonda se establecen en el cuadro 6. Los componentes de reacción reciben la detección de las diversas transcripciones son revelados en la tabla 7, y las condiciones de las reacciones de PCR se resumen en la tabla 8. La fracción fluorescente FAM (6 carboxi fluoresceína Amidite) se excitó a 465 nm y la fluorescencia se midió a 510 nm; los valores correspondientes para la molécula fluorescente hexagonal (hexaclorofluoresceína) fueron 533 nm

y 580 nm.

Tabla 6. Secuencias de Oligonucleótido utilizadas para los análisis moleculares de los niveles de transcripción en el maíz transgénico.

Objetivo	Oligonucleótido	SEQ ID NO.	Secuencia
Per5 3'UTR	P5U76S (F)	53	ttgtgatgttggtggcgat
Per5 3'UTR	P5U76A (R)	54	tgtaaataaaaccccaaagatcg
Per5 3'UTR	Roche UPL76 (Sonda-FAM)	NAv**	Roche Diagnostics Catalog Number 488996001
TIP41	TIPmxF	55	TGAGGGTAATGCCAACTGGTT
TIP41	TIPmxR	56	GCAATGTAACCGAGTGTCTCTCAA
TIP41	HXTIP (Sonda-HEX)	57	TTTTTGGCTTAGAGTTGATGGTGTACTGA TGA

*TIP41-similar a la proteína. **NAv Secuencia no disponible del proveedor.

Tabla 7. Recetas de la reacción de PCR para la detección de la transcripción.

	Per5 3'UTR	TIP-similar al Gen
Componente	Concentración Final	
Tampón Roche	1 X	1X
P5U76S (F)	0.4 μ M	0
P5U76A (R)	0.4 μ M	0
Roche UPL76 (FAM)	0.2 μ M	0
HEXtipZMF	0	0.4 μ M
HEXtipZMR	0	0.4 μ M
HEXtipZMP (HEX)	0	0.2 μ M
ADNc (2.0 μ L)	NA	NA
Agua	A 10 μ L	A 10 μ L

Tabla 8. Termociclador condiciones para ARN qPCR.

Per5'3'UTR y TIP41-similar a la Detección del Gen			
Proceso	Temp.	Tiempo	No. de Ciclos
Activación de objetivo	95°C	10 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	40
Extender	60°C	40 seg	
Adquirir FAM o HEX	72°C	1 seg	
Enfriamiento	40°C	10 seg	1

Los datos se analizaron utilizando el LIGHTCYCLER® Software v1.5 por cuantificación relativa utilizando un algoritmo máximo derivado segundo para el cálculo de los valores de Cq según las recomendaciones del proveedor. Para los análisis de expresión, expresión valores fueron calculados usando el método $\Delta\Delta C_t$ (es decir, $2^{-(Cq_{OBJETIVO} - REF Cq)}$), que se basa en la comparación de las diferencias de valores Cq entre dos objetivos, con el valor base de ser seleccionado bajo la suposición de que, para las reacciones de PCR optimizadas, el producto duplica cada ciclo 2.

Tamaño de transcripción de horquilla e integridad:

Ensayo de Northern Blot En algunos casos, la caracterización molecular adicional de las plantas transgénicas se obtiene mediante el uso del análisis de Northern Blot (mancha de ARN) para determinar el tamaño molecular de la horquilla rnapII-140 ARN en las plantas transgénicas que expresan un rnapII-

140 horquilla ARNds.

Todos los materiales y equipos son tratados con RNAZAP (AMBION/INVITROGEN) antes de su uso. Se recogen muestras de tejido (100 mg a 500 mg) en 2 mL tubos EPPENDORF
5 SAFELOCK, interrumpido con un pulverizador de tejido KLECKO™ (fabricación de GARCIA, Visalia, CA) con tres granos del tungsteno en 1 mL de TRIZOL (INVITROGEN) durante 5 minutos, luego se incubaron a temperatura ambiente (RT) durante 10 minutos. Opcionalmente, las muestras se centrifugaron
10 durante 10 min a 4° C a 11.000 rpm y el sobrenadante se transfiere en un fresco 2 mL tubo EPPENDORF SAFELOCK. Después el homogeneizado se añaden 200 µL de cloroformo, el tubo es mezclar por inversión para 2 a 5 min, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a
15 12.000 x g durante 15 min a 4° C. La fase superior se transfiere en un tubo EPPENDORF de 1,5 mL estéril, se agregan 600 µL de isopropanol al 100%, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 10 min a 2 h, luego se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min a 4° c a 25° C. Se
20 descarta el sobrenadante y el sedimento del ARN se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70%, con centrifugación a 7.500 x g durante 10 min a 4° c a 25° C entre lavados. El etanol es descartado y el comprimido es brevemente aire secado durante 3 a 5 min antes de resuspender en 50 µL de agua libre de
25 nucleasas.

ARN total se cuantifica mediante el NANODROP® 8000 (THERMO FISHER) y las muestras se normalizan a 5 µg/10 µL.

10 μ L de glioxal (AMBION/INVITROGEN) se añaden a cada muestra. Cinco a 14 ng de mezcla estándar marcador DIG ARN (ROCHE APPLIED SCIENCE, Indianapolis, IN) son dispensados y agregar un volumen igual de glioxal. Las muestras y marcador
5 RNAs se desnaturalizan a 50° C por 45 min y almacenado en hielo hasta el cargamento en un 1,25% gel de agarosa (LONZA, Allendale, NJ) SEAKEM oro en NORTHERNMAX 10 X glioxal corriendo tampón (AMBION/INVITROGEN) RNAs están separados por electroforesis a 65 voltios/30 mA durante 2 horas y 15
10 minutos.

Después de la electroforesis, el gel es aclarado en 2 X SSC por 5 min y reflejado en una estación de GEL DOC (BIORAD, Hercules, CA), entonces el ARN pasivamente es transferido a una membrana de nailon (MILLIPORE) durante la
15 noche en el RT, usando 10 X SSC como el tampón de transferencia (20 X SSC consta de 3 M de cloruro de sodio y 300 mM de citrato trisódico, pH 7.0). Después de la transferencia, la membrana se enjuaga en 2 X SSC durante 5 minutos, el ARN es reticulado UV a la membrana
20 (AGILENT/STRATAGENE) y la membrana se deja secar a temperatura ambiente durante 2 días.

La membrana es prehibridada en el tampón de ULTRAHYB (AMBION/INVITROGEN) durante 1 a 2 h. La sonda consta de un producto amplificado de la polimerización en
25 cadena que contiene la secuencia de interés (por ejemplo, la secuencia antisentido parte de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17, según proceda) marcado con digoxigenina mediante un

procedimiento de cavar ROCHE de ciencia aplicada. La hibridación en el tampón recomendada es durante la noche a una temperatura de 60°C en tubos de hibridación. Después de hibridación, el borrón es sometido a lavados DIG, envuelto, expuesto a la película de 1 a 30 minutos, luego la película se desarrolla, por métodos recomendados por el proveedor del equipo de excavación.

Determinación del número de copia de transgen

Los pedazos de hojas de maíz aproximadamente equivalentes a 2 golpes de hoja se recolectaron en 96 placas de colección del pocillo (QIAGEN). Interrupción del tejido se realizó con un pulverizador de tejido KLECKO™ (fabricación de GARCIA, Visalia, CA) en tampón de lisis BIOSPRINT96 AP1 (suministrado con el equipo de una planta BIOSPRINT96; QIAGEN) con un grano de acero inoxidable. Después de la maceración del tejido, ADN genómico (gDNA) fue aislado en formato de alto rendimiento utilizando un equipo de planta BIOSPRINT96 y un robot de extracción de BIOSPRINT96. Extracción de ADN genómico fue diluido 2:3 ADN: agua antes de configurar la reacción qPCR.

Análisis de qPCR. Se realizan detección de transgen por análisis de sonda hidrólisis por tiempo real PCR usando un sistema LIGHTCYCLER® 480. Oligonucleótidos para ser utilizado en los ensayos de sonda hidrólisis para detectar la secuencia del intrón de ST LS1 (SEQ ID NO: 19), o para detectar una porción del gen SpecR (es decir el gen de resistencia espectinomicina soportado en los plásmidos de

vector binario; SEQ ID NO: 58; SPC1 oligonucleótidos en la tabla 9), fueron diseñados usando LIGHTCYCLER® sonda diseño SOFTWARE 2.0. Además, oligonucleótidos para ser utilizado en los ensayos de sonda hidrólisis para detectar un segmento del gen 1 AAD herbicida tolerancia (SEQ ID NO: 59; Oligonucleótidos GAAD1 en la tabla 9) fueron diseñados usando software cadena EXPRESS (APPLIED BIOSYSTEMS). Tabla 9 muestra las secuencias de los cebadores y sondas. Los ensayos eran multiplexados con reactivos para un gen cromosómico maíz endógeno (invertasa (SEQ ID NO: 60; No adhesión GENBANK®: U16123; contempladas en el presente como IVR1), que sirvió como una secuencia de referencia interna para asegurar gDNA estuvo presente en cada ensayo. Para la amplificación, la mezcla de LIGHTCYCLER® 480 PROBES MASTER (ROCHE APPLIED SCIENCE) fue preparado en la concentración final de 1x en una reacción múltiplex de volumen 10 µL que contiene 0.4 µM de cada iniciador y 0.2 µM de cada sonda (Tabla 10). Una reacción de dos etapas de amplificación fue realizada como se indica en la tabla 11. La Activación del fluoróforo y la emisión de la FAM y HEX etiquetados sondas fueron como describen anteriormente; CY5 conjugados son excitados máximo de 650 nm y fluorescencia máximo de 670 nm.

Los Puntajes de CP (el punto en el cual la fluorescencia de la señal cruza el umbral de fondo) se determinaron a partir de los datos PCR de tiempo real utilizando el algoritmo de ajuste puntos (versión 1.5 de LIGHTCYCLER® SOFTWARE) y el módulo de Quant relativa (basado

en el método de Ct). Los datos fueron tratados como se describe anteriormente (supra; ARN qPCR).

Tabla 9. Las Secuencias de los cebadores y sondas (con el conjugado fluorescente) utilizadas para gen copia números determinaciones y detección de red troncal de plásmido vector binario.

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
GAAD1-F	64	TGTTGCGTTCCCTCTACCAA
GAAD1-R	65	CAACATCCATCACCTTGACTGA
GAAD1-P (FAM)	66	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA
IVR1-F	67	TGGCGGACGACGACTTGT
IVR1-R	68	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT
IVR1-P (HEX)	69	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC
SPC1A	70	CTTAGCTGGATAACGCCAC
SPC1S	71	GACCGTAAGGCTTGATGAA
TQSPEC (CY5*)	72	CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA

CY5 = Cianina-5

Tabla 10. Componentes de la reacción para gen copiar números análisis y detección de la columna vertebral de plásmido del vector binario.

Componente	Amt. (µL)	Almacenamiento	Concentración Final
Tampón 2x	5.0	2x	1x
Cebador delantero Adecuado	0.4	10 µM	0.4
Cebador Inverso Adecuado	0.4	10 µM	0.4
Sonda Adecuada	0.4	5 µM	0.2
Cebador Delantero-IVR1	0.4	10 µM	0.4
Cebador Inverso-IVR1	0.4	10 µM	0.4
Sonda-IVR1	0.4	5 µM	0.2
H ₂ O	0.6	NA*	NA
ADNg	2.0	ND**	ND
Total	10.0		

*NA = No Aplica

**ND = Sin Determinar

Tabla 11. Termociclador condiciones para ADN qPCR

Análisis del número de copia Genómica			
Proceso	Temp.	Tiempo	No. de Ciclos
Activación de objetivo	95°C	10 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	40
Extender & Adquirir FAM, HEX, o CY5	60°C	40 seg	
Enfriamiento	40°C	10 seg	1

Ejemplo 8Bioensayo de maíz transgénico

In vitro insecto bioensayos bioactividad de ARNds producida en las células vegetales es demostrada por métodos biológicos. Véase, por ejemplo, Fire et al. (2007) NAT Biotechnol. 25 (11):1322-1326, (1326)). Uno es capaz de demostrar la eficacia, por ejemplo, por la alimentación de diversos tejidos vegetales o piezas de tejido derivados de una planta que produce un insecticida ARNds a insectos objetivo en un entorno controlado de alimentación. Alternativamente, se prepararon extractos de diversos tejidos de planta derivados de una planta que produce el insecticida ARNds y los ácidos nucleicos extraídos son dispensados en la cima de dietas artificiales para los bioensayos según se describió anteriormente en este documento. Se comparan los resultados de dichos ensayos de alimentación igualmente realizaron bioensayos que emplean tejidos de control adecuado de plantas hospederas que no producen un insecticida ARNds, o para otras muestras de control.

20 Bioensayos de Insectos in vivo con eventos transgénicos de maíz

Dos larvas de crisomela del maíz (1 a 3 días) nacidas de huevos lavados son seleccionadas y colocadas en cada pocillo de la bandeja de bioensayo. Los pozos son entonces cubiertos con una cubierta de ficha "Tire N' pelar" (16 CV de BIO, BIO SERV) y colocados en una incubadora de 28° C con un ciclo de luz/oscuridad 18 h/6 h. Nueve días después

de la infestación inicial, las larvas son evaluadas para la mortalidad, que se calcula como el porcentaje de insectos muertos en el número total de insectos en cada tratamiento. Las muestras de insectos están congeladas a 20° C durante dos días, luego las larvas de los insectos de cada tratamiento se combinaron y se pesó. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calcula como el peso medio de los tratamientos experimentales divididos por la media del peso de tratamientos de pocillo de control. Los datos se expresan como una inhibición del crecimiento por ciento (de los controles negativos). Pesos promedios que exceden el control significa peso se normalizan a cero.

Bioensayos de insectos en invernadero. Los huevos de crisomela del maíz (WCR, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) fueron recibidos en el suelo de CROP CHARACTERISTICS (Farmington, MN). Huevos WCR se incubaron a 28° C durante 10 a 11 días. El huevo fue lavado del suelo, colocado en una solución de agar 0.15%, y la concentración se ajustó a aproximadamente 75 a 100 huevos por 0.25 mL alícuota. Una placa de la compuerta se estableció en una placa Petri con una alícuota de suspensión de huevo para monitorear tasas de escotilla.

El suelo alrededor de las plantas de maíz crece en ROOTRAINERS ® estaba infestado de 150 a 200 huevos de circulante. Los insectos fueron permitidos para alimentar por 2 semanas, tras lo cual un "Rating de raíz" fue dado a cada planta. Una escala de lesión de nodo fue utilizada para

clasificar esencialmente según Oleson et al. (2005) *J. Mol. Entomol.* 98(1):1-8. Las plantas que han aprobado este bioensayo fueron trasplantadas a macetas de 18,9 litros para la producción de semilla. Los trasplantes fueron tratados con insecticida para prevenir mayores daños gusano de la raíz y la liberación de insectos en los invernaderos. Las plantas fueron polinizadas manualmente para la producción de semilla. Semillas producidas por estas plantas fueron salvadas para la evaluación en el T₁ y las generaciones subsiguientes de las plantas.

Bioensayos de invernadero incluyen dos tipos de plantas de control negativo. Las plantas transgénicas control negativo fueron generadas por la transformación con vectores albergando genes diseñados para producir una proteína fluorescente amarilla (YFP) o una horquilla YFP ARNs (ver ejemplo 4). Control negativo nontransformed plantas fueron cultivadas de semillas de líneas 7sh382 o B104. Los bioensayos se llevaron a cabo en dos fechas separadas, con controles negativos incluyeron en cada conjunto de materiales vegetales.

Tabla 12 muestra los resultados combinados de los análisis moleculares y bioensayos para plantas de horquilla rnapII-140. Examen de los resultados de la prueba biológica resumidos en el cuadro 12 revela la sorprendente e inesperada observación que la mayoría de las plantas de maíz transgénicas albergando construcciones que expresan un rnapII-140 horquilla ARNs compuesto por segmentos de SEQ ID

NO: 1, por ejemplo, como se ejemplifica en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, estén protegida contra raíz daños ocasionados por la alimentación de las larvas de crisomela del maíz. Sólo seis de los 36 eventos graduales tenía una raíz clasificación de 0.75 o mayor. La Tabla 13 muestra los resultados combinados de los análisis moleculares y bioensayos para las plantas control negativo. La mayoría de las plantas no tenían ninguna protección contra las larvas WCR alimentación, aunque cinco de los 34 clasificados plantas tenían una raíz clasificación de 0.75 o inferior. La presencia de algunas plantas teniendo decenas de raíz baja calificaciones entre la planta de control negativo situado a veces se observa y refleja la variabilidad y la dificultad de llevar a cabo este tipo de prueba biológica en un entorno de efecto invernadero.

Tabla 12. Bioensayo de efecto invernadero y los resultados de los análisis moleculares de rnapII-140 de horquilla expresando las plantas de maíz.

5

10

15

20

25

Id. de muestra	Tejido de hoja		Tejido de raíz		Clasificación de raíz
	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	
Eventos RNAPII v1					
114524[1]-001.001	0.089	72.5	0.023	95.0	0.1
114524[1]-002.001	0.093	91.8	0.093	174.9	0.1
114524[1]-004.001	0.179	110.7	0.245	105.4	0.01
114524[1]-005.001	0.073	76.6	0.126	209.4	0.01
114524[1]-007.001	0.103	62.2	0.147	73.0	0.05
114524[1]-008.001	0.147	71.5	0.151	106.9	0.01
114524[1]-009.001	0.240	157.6	0.151	213.8	0.25
114524[1]-011.001	0.299	160.9	0.158	108.4	0.5
114524[1]-012.001	0.361	176.1	0.127	227.5	0.25
114524[1]-013.001	15.455	266.9	0.035	144.0	1
114524[1]-015.001	0.737	205.1	0.064	206.5	0.25
114524[1]-016.001	0.758	171.3	0.045	148.1	0.05
114524[1]-017.001	0.435	458.3	0.066	203.7	0.01
114524[1]-018.001	0.521	221.3	0.156	254.2	0.1
114524[1]-022.001	0.330	224.4	0.166	151.2	0.01
114524[1]-023.001	0.429	219.8	0.055	150.1	0.1
114524[1]-024.001	0.683	261.4	0.901	369.6	0.1
114524[1]-025.001	0.266	179.8	0.063	170.1	0.01
114524[1]-027.001	0.106	45.9	0.026	33.6	1
114524[1]-029.001	0.321	152.2	0.088	125.4	0.1
114524[1]-030.001	0.248	112.2	0.060	192.7	NG**

5	Id. de muestra	Tejido de hoja		Tejido de raíz		Clasificación de raíz
		ST-LS1 RTL*	PER5UTR RTL	ST-LS1 RTL*	PER5UTR RTL	
10	Eventos RNAPII v2					
	114525[1]-001.001	0.132	97.0	0.019	50.6	0.1
	114525[1]-002.001	0.118	109.1	0.144	121.1	0.01
	114525[1]-006.001	0.257	150.1	0.107	229.1	0.05
	114525[1]-012.001	0.221	75.6	0.082	179.8	0.01
	114525[1]-014.001	0.090	44.3	0.060	70.0	0.01
	114525[1]-015.001	0.768	136.2	0.057	43.1	0.05
	114525[1]-016.001	0.096	54.2	0.209	93.1	0.75
	114525[1]-017.001	0.376	65.3	0.268	61.0	NG**
	114525[1]-018.001	0.476	125.4	0.132	64.9	NG**
15	114525[1]-019.001	0.134	0.1	0.000	1.7	1
	114525[1]-020.001	0.655	141.0	0.060	127.1	0.1
	114525[1]-021.001	0.683	176.1	1.670	227.5	1
	114525[1]-023.001	0.438	134.4	0.059	199.5	0.25
	114525[1]-025.001	0.785	171.3	0.145	150.1	0.01
20	114525[1]-030.001	0.000	0.1	0.000	0.6	1
	114525[1]-032.001	0.737	202.3	0.143	69.6	0.05
	114525[1]-034.001	1.376	233.9	0.071	113.0	0.05
	114525[1]-035.001	0.611	118.6	0.067	111.4	0.05

*RTL = Nivel de Transcripción Relativo mientras se mide contra los niveles de Transcripción de gen similar a-TIP4.

**NG = No evaluado debido al tamaño pequeño de la planta

Tabla 13. Bioensayo de invernadero y resultados de

los análisis moleculares de las plantas control negativo que comprende las plantas de maíz transgénicas y nontransformed.

Id. de la muestra	Tejido de hoja		Tejido de raíz		Clasificación de raíz
	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	
101556[679]-10513.001	0.000	0.0	0.000	32.7	1
101556[679]-10514.001	0.173	171.3	0.240	202.3	1
101556[679]-10515.001	0.000	42.5	0.000	45.6	1
101556[679]-10516.001	0.000	18.9	0.000	65.3	0.75
101556[677]-10524.001	0.000	315.2	0.000	364.6	1
101556[677]-10525.001	0.000	184.8	0.000	95.0	1
101556[677]-10526.001	0.000	0.2	0.000	0.3	1
101556[677]-10527.001	0.000	170.1	0.000	128.0	1
101556[677]-10528.001	0.000	179.8	0.067	104.0	1
101556[677]-10529.001	0.000	98.4	0.000	38.9	1
Eventos de horquilla YFP					
110853[8]-289.001	0.117	97.0	0.122	65.3	0.5
110853[8]-290.001	0.098	70.0	0.272	79.3	1
110853[8]-291.001	0.084	36.3	0.107	86.2	1
110853[8]-293.001	0.088	79.9	0.624	101.1	0.05
110853[8]-294.001	0.079	35.8	0.117	54.2	1
110853[8]-295.001	0.095	82.7	0.114	145.0	1
110853[8]-296.001	0.097	59.7	0.158	79.9	1
110853[8]-297.001	0.106	0.1	0.000	2.5	1
110853[8]-298.001	0.000	0.1	0.000	32.9	1
110853[8]-299.001	0.354	143.0	0.308	101.8	1
110853[8]-300.001	0.500	159.8	0.085	139.1	1
110853[8]-301.001	0.304	174.9	1.007	111.4	1

Id. de la muestra	Tejido de hoja		Tejido de raíz		Clasificación de raíz
	ST-LS1 RTL*	PER5UTR RTL	ST-LS1 RTL*	PER5UTR RTL	
Plantas no transformadas					
7sh382	0.000	0.1	0.000	0.2	0.75
7sh382	0.000	0.1	0.000	0.1	1
7sh382	0.000	0.1	0.000	6.1	NG**
7sh382	0.000	0.4	0.000	1.6	1
7sh382	0.287	0.0	0.000	ND***	1
7sh382	0.000	0.2	0.000	0.3	0.75
B104	0.000	0.2	0.000	0.2	1
B104	0.000	0.0	0.000	0.6	1
B104	0.000	0.1	0.000	0.3	1
B104	0.000	0.4	1.000	1.0	1
B104	0.000	0.1	0.000	0.5	1
B104	0.000	0.0	0.000	205.1	1
B104	0.077	0.1	0.000	4.4	1

*RTL = Nivel de Transcripción Relativa mientras se mide contra los niveles de Transcripción de gen similar a-TIP4.

**NG = No catalogado debido a un tamaño de planta pequeño.

***ND = Sin realizar.

Ejemplo 9

Transgénicos Zea mays que comprende secuencias de plagas de coleóptero

Diez a 20 de las plantas transgénicas T₀ Zea mays

se generan como se describe en el ejemplo 6. Otras líneas independientes 10 20 T₁ Zea mays adicionales que expresan ARNi se obtienen para el desafío de la crisomelas del maíz. ARNi incluye SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o de otro modo más

5 comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5. La horquilla adicional ARNi se deriva, de las secuencias plagas de coleópteros que incluye Caf1 180 (US patente solicitud publicación N° 2012/0174258), VatpaseC (US patente solicitud publicación N° 2012/0174259), Rho1 (US patente solicitud publicación N°

10 2012/0174260), VatpaseH (US patente solicitud publicación N° 2012/0198586), PPI 87B (US patente solicitud publicación N° 2013/0091600), RPA70 (US patente solicitud publicación N° 2013/0091601), o RPS6 (patente solicitud publicación N° 2013/0097730). Estos son confirmados a través de RT PCR u

15 otros métodos de análisis molecular. Las preparaciones de ARN total de líneas T₁ independientes seleccionados donde ARNi contiene un intron AT-LS1 se utilizan para la RT PCR con cebadores diseñados para unirse en el intrón ST LS1. Además, los cebadores específicos para cada gen objetivo en un

20 constructo ARNi se utilizan para amplificar y confirmar que la producción del pre procesado ARNm necesaria para la producción de ARNsi en planta cuando sea adecuado. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión de la horquilla del ARN en cada planta

25 transgénica de mays Zea. El procesamiento de ARNi en ARNsi se confirma posteriormente en líneas transgénicas independientes mediante hibridaciones de la mancha blanca /negra de ARN.

Arni moléculas con secuencias de desajuste con más
 identidad 80% secuencia de genes objetivo afectan catarinitas
 de maíz en forma similar a la observada con las moléculas de
 ARNi tener identidad de secuencia de 100% de los genes
 5 objetivo el emparejamiento de secuencia de desajuste con
 secuencias nativas para formar ARNds entrega la planta de
 procesado siRNAs que afecta el crecimiento, desarrollo y
 viabilidad de alimentación plagas de coleópteros.

En la entrega de la planta de ARNds, ARNsi o ARNmi
 10 correspondientes a genes objetivo y la posterior absorción
 por plagas de coleópteros a través de resultados en baja
 regulación de los genes objetivo de alimentación en la plaga
 a través del ARN de coleópteros mediación silenciamiento
 génico. Cuando la función de un gen objetivo es importante
 15 en una o más etapas de desarrollo, crecimiento, desarrollo y
 reproducción de la plaga de coleópteros es afectado y en el
 caso de al menos uno de WCR, NCR, SCR, MCR, aparece D.
 balteata LeConte, u. D. tenella y u. D. undecimpunctata
 Mannerheim, conducen a la falta de éxito infestan, alimentar,
 20 desarrollar o reproducir, o conduce a la muerte de la plaga
 de coleópteros. La elección de genes objetivo y la exitosa
 aplicación de ARNi entonces se utilizan para controlar las
 plagas de coleópteros.

Comparación fenotípica de líneas ARNi transgénicas
 25 y nontransformed Zea mays. Los genes plagas de coleópteros
 objetivo o secuencias seleccionadas para la creación de
 horquilla ARNi no tienen ninguna semejanza considerable a

cualquier otra secuencia de genes de planta conocida. Por lo tanto, la producción o la activación de ARNi (sistémica) por construcciones dirigidas a estos genes de plagas de coleópteros o secuencias no tiene efecto deletéreo sobre las plantas transgénicas. El desarrollo y características morfológicas de líneas transgénicas se comparan con las plantas nontransformed, así como los de líneas transgénicas transformadas con un vector "vacío" no tener ninguna horquilla que expresa el gen. Las características de la raíz, disparar, follaje y reproducción se comparan. No hay diferencias observables en los patrones de crecimiento y longitud de raíz de plantas transgénicas y nontransformed. Las características del brote de la planta tales como altura, hoja números y tamaños, época de floración, floral tamaño y apariencia son similares. En general, no hay diferencias morfológicas observables entre líneas transgénicas y sin expresión de moléculas de ARNi objetivo cuando cultivadas in vitro y en el suelo en invernadero.

20

Ejemplo 10

Transgénicos Zea mays que comprende una secuencia de plagas coleóptero y consructos ARNi adicionales

25

Una planta transgénica de mays Zea que comprende una secuencia de codificación heteróloga en su genoma que se transcribe para producir una molécula de ARNi que dirige un organismo que no sea una plaga de coleópteros secundaria se transforma mediante metodologías Agrobacterium o bigotes TM

(véase Petolino y Arnold (2009) métodos de Mol. Biol. 526:59-67) para producir una o más moléculas ARNds insecticida (por ejemplo, al menos una molécula de ARNds incluyendo una molécula de ARNi apuntando a un gen que comprende SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5). Los vectores de plásmido de transformación planta preparados esencialmente como se describe en el ejemplo 4 se entregan vía *Agrobacterium* o bigotes [™] mediada por métodos de transformación a células de maíz suspensión o embriones inmaduros de maíz obtenidos de un Hi II o B104 *Zea mays* planta transgénica que comprende una secuencia de codificación heteróloga en su genoma que se transcribe para producir una molécula de ARNi que dirige un organismo que no sea una plaga de coleópteros. Los embríos transformados resultantes se utilizan para regenerar todas las plantas que se demuestra que tienen resistencia a una plaga de coleopterán y el organismo exceptuando una plaga de coleopterán.

Ejemplo 11

Transgénicos *Zea mays* que comprende un constructo ARNi y secuencias de Control de plagas de coleóptero adicionales

Una planta transgénica de *mays Zea* que comprende una secuencia de codificación heteróloga en su genoma que se transcribe para producir una molécula de ARNi que dirige un organismo de plagas de coleópteros (por ejemplo, al menos una molécula de ARNds incluyendo una molécula de ARNds apuntando

a un gen que comprende SEQ ID NO: 1, 3, 4, o 5) secundario se transforma mediante metodologías *Agrobacterium* o bigotes [™] para producir una o más moléculas de proteína insecticida, proteínas insecticidas por ejemplo, Cry3, Cry34 y Cry35.

5 Vectores de plásmido de transformación planta preparados esencialmente como se describe en el ejemplo 4 se entregan vía *Agrobacterium* o bigotes [™] mediada por métodos de transformación a células de maíz suspensión o embriones inmaduros de maíz obtenidos de una planta transgénica de mays

10 Zea B104 compuesto por una secuencia de codificación heteróloga en su genoma que se transcribe en una molécula para producir ARNi que dirige un organismo plagas de coleópteros. Plantas doblemente transformadas que producen ARNi moléculas y proteínas insecticidas para el control de

15 plagas de coleópteros obtienen.

Ejemplo 12

Transcriptoma de Polen escarabajo

Insectos: Se colectaron larvas e insectos adultos

20 polen de campos con las plantas florecientes colza (Giessen, Alemania). Los escarabajos adultos jóvenes (cada uno por el grupo de tratamiento: n = 20; 3 repeticiones) fueron desafiados mediante la inyección de una mezcla de dos diferentes bacterias (*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas*

25 *aeruginosa*), una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y LPS bacterianos. Cultivos bacterianos se cultiva a 37 ° C con agitación, y la densidad óptica fue monitoreada a 600 nm

(OD600). Las células fueron cosechadas en OD600 ~1 por centrifugación y resuspendidos en fosfato tampón salino. La mezcla se introdujo ventrolateralmente pinchando el abdomen de imago de escarabajo de polen usando una aguja de disección sumergida en una solución acuosa de 10 mg/ml LPS (endotoxina purificada e. coli; Sigma, Taufkirchen, Alemania) y los cultivos de bacterias y levaduras. Junto con la ingenua inmune escarabajos impugnada se recolectaron los escarabajos y larvas (n = 20 y 3 repeticiones cada uno) en el mismo punto de tiempo.

Aislamiento ARN: ARN total fue extraído 8 h después de la inmunización de congelados los escarabajos y larvas usando TriReagent (centro de investigación Molecular, Cincinnati, OH, USA) y purificado mediante el equipo de Micro RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) en cada caso siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se verificó mediante un bioanalizador Agilent 2100 y un ARN 6000 Nano equipo (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La cantidad de ARN se determinó usando un espectrofotómetro NANODROP® ND 1000. ARN fue extraído de cada uno de los grupos de tratamiento inducida inmune adulto, grupos de control para adultos y grupos de larvas individualmente y cantidades iguales de ARN total posteriormente se combinaron en una piscina por muestra (inmune desafiado a los adultos, larvas y adultos de control) para la secuencia.

Información Transcriptoma: Generación de datos ARN Seq y lectura única de ensamblaje 100 bp ARN Seq se

llevó a cabo por separado en 5 ARN de MG total aislado de inmune desafiaron escarabajos adultos, ingenua (control) escarabajos adultos y larvas no tratadas. La secuencia fue realizada por Eurofins MWG Operon utilizando la plataforma
 5 Illumina HiSeq 2000. Esto produjo 20,8 millones de lecturas para la muestra de control para adultos del escarabajo, 21,5 millones de lecturas para los LPS desafió muestra escarabajo adulto y 25,1 millones de lecturas para la muestra de larva. Las lecturas agrupadas (67,5 millones) fueron ensambladas
 10 utilizando el software ensamblador de terciopelo/Oasis (M.H. Schulz et al. Bioinformática 28:1086-92; Zerbino & investigación del genoma de E. Birney (2008). 18:821-9). El transcriptoma contenía 55648 secuencias.

Identificación del RNAPII del escarabajo del polen:

15 La búsqueda de tBLASTn del transcriptoma fue utilizada para identificar contigs coincidente. Como una consulta la secuencia de péptido del RPB2 de subunidad II de polimerasa ARN dirigida de ADN se *Tribolium castaneum* se utilizó (GENBANK ® XP_974653.1). Nueve contigs se identificaron
 20 (RGK_contig_35101, RGK_contig15220, RGK_contig54586, RGK_contig33671, RGK_contig54748, RGK_contig50449, RGK_contig26724, RGK_contig40010, RGK_contig14232). Las brechas entre los contigs se completaron con lecturas sin montar usando una herramienta interna. GAP5 (Bonfield JK &
 25 Whitwham (2010). Bioinformática 1699-1703) fue utilizado para la verificación de secuencias.

Ejemplo 13Mortalidad de polen escarabajo (*Meligethes aeneus*)
después del tratamiento con rna-II ARNi

Los cebadores específicos de gen incluyendo la
5 secuencia de promotor T7 polimerasa en el extremo 5' se
usaron para crear los productos de PCR de aproximado de 500
bp por PCR (SEQ ID NOs: 78 y 79). Fragmentos de PCR fueron
clonados en el vector fácil pGEM T según protocolo del
fabricante y enviados a una empresa de secuenciación para
10 verificar la secuencia. El ARNs entonces fue producido por
la polimerasa del ARN T7 (MEGAscript ® equipo de ARNi,
Applied Biosystems) de una construcción PCR generada a partir
del plásmido secuenciado según protocolo del fabricante.

Inyección de ~ 100 nl ARNs (1 ug/ul) (SEQ ID NO:
15 77) (n=10; 3 replicaciones biológicas) en larvas y adultos se
realizó con un micromanipulador bajo una disección
Estereomicroscopio. Los animales fueron anestesiados sobre
hielo antes de que ellos fueron fijadas a la cinta de doble
cara. Controles recibieron el mismo volumen de agua. Se
20 llevaron a cabo un control negativo ARNs del IMPI (insectos
Metaloproteinasa gen del inhibidor de los lepidópteros
Galleria mellonella). Todos los controles en todas las etapas
no podrían ser probados debido a la falta de animales.

Escarabajos de polen se mantuvieron en placas de
25 Petri con polen seco y un tejido mojado. Las larvas fueron
criadas en cajas de plástico en la inflorescencia de canola
en un medio de agar y agua.

Tabla 14. Resultados del bioensayo de la inyección del escarabajo de polen adulto

Tratamiento	% Medio de sobrevivencia $\pm$ SD*				
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
<i>mapll</i>	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	97 $\pm$ 6	93 $\pm$ 6	90 $\pm$ 0
agua	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	97 $\pm$ 6
	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16	
<i>mapll</i>	87 $\pm$ 6	83 $\pm$ 12	73 $\pm$ 29	73 $\pm$ 29	
agua	90 $\pm$ 10	90 $\pm$ 10	90 $\pm$ 10	90 $\pm$ 10	

* Desviación estándar

Tabla 15. Resultados del bioensayo de inyección polen larvas del escarabajo.

Tratamiento	% Medio de sobrevivencia $\pm$ SD*			
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6
<i>mapll</i>	100 $\pm$ 0	70 $\pm$ 10	13 $\pm$ 12	10 $\pm$ 10
Control negativo	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	97 $\pm$ 6	73 $\pm$ 21

* Desviación estándar

Los controles fueron realizados en una fecha diferente debido a la limitada disponibilidad de insectos.

Ensayo de alimentación: Los escarabajos se mantuvieron sin acceso al agua en los tubos de vacío Halcón 24 h antes del tratamiento. Una gotita de ARNds (~ 5µl) fue colocada en una pequeña placa de Petri y 5 a 8 escarabajos fueron agregados a la caja Petri. Los animales fueron

observados en un Estereomicroscopio y aquellos que ingirió ARNds que contiene solución dieta fueron seleccionados para la prueba biológica. Los escarabajos fueron transferidos en placas de Petri con polen seco y un tejido mojado. Controles recibieron el mismo volumen de agua. Se realizó un control negativo ARNds del IMPI (insectos Metaloproteinasa gen del inhibidor de los lepidópteros *Galleria mellonella*). Todos los controles en todas las etapas no podrían ser probados debido a la falta de animales.

Tabla 16. Resultados de bioensayo de alimentación del adulto.

Tratamiento	% Medio de sobrevivencia $\pm$ SD*				
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
<i>mapll</i>	100 $\pm$ 0	97 $\pm$ 6	90 $\pm$ 10	87 $\pm$ 6	87 $\pm$ 6
Control negativo	100 $\pm$ 0	93 $\pm$ 5.8	90 $\pm$ 10	87 $\pm$ 5.8	83 $\pm$ 5.8
agua	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	93 $\pm$ 3.8	93 $\pm$ 3.8
	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16	
<i>mapll</i>	80 $\pm$ 10	70 $\pm$ 10	67 $\pm$ 15	60 $\pm$ 10	
Control negativo	80 $\pm$ 10	80 $\pm$ 10	80 $\pm$ 10	77 $\pm$ 12	
agua	93 $\pm$ 3.8	87 $\pm$ 10	80 $\pm$ 13	80 $\pm$ 13	

* Desviación estándar

Los controles fueron realizados en una fecha diferente debido a la limitada disponibilidad de insectos.

Transformación mediada por *Agrobacterium* de
hipocotilos de colza (*Brassica napus*)

Preparación de *Agrobacterium*

La cepa de *Agrobacterium* que contiene un plásmido
5 binario es rayada afuera en los medios de comunicación YEP
(Bacto peptona [™] 20,0 gm/L y levadura extraer 10,0 gm/L)
placas conteniendo estreptomycin (100 mg/ml) y
espectinomycin (50 mg/mL) y se incubaron durante 2 días a 28
° C. La cepa de *Agrobacterium* propagada que contiene el
10 plásmido binario es raspada de la placa de racha de 2 días
utilizando un asa de inoculación estéril. La cepa de
Agrobacterium rascada que contiene el plásmido binario se
inocula en 150 mL modificado YEP líquido con estreptomycin
(100 mg/ml) y espectinomycin (50 mg/ml) en 500 mL estéril
15 Deutsch desconcertado y sacudida a 200 rpm a 28 ° C. Los
cultivos son centrifugados y resuspendidos en M-medio (sales
de LS, 3% de glucosa, vitaminas B5 modificadas, cinetina 1
µM, 1 µM, 2, 4-D, pH 5.8) diluidos a la densidad adecuada (50
Klett unidades medida usando un espectrofotómetro) antes de
20 la transformación de hipocotilos de canola.

Transformación de canola

Germinación de las semillas Semillas de canola
(var. 710 NEXERA [™]) están esterilizadas en la superficie en
10% Clorox [™] por 10 minutos y se enjuagan tres veces con
25 agua destilada estéril (semillas están contenidas en los
tamices de acero durante este proceso). Las semillas se
siembran para la germinación en medio de Canola de ½ MS (MS

de 1/2, 2% de sacarosa, 0.8% de agar) contenida en Phytatrays[™] (25 semillas por Phytatray[™]) y colocado en una cámara de crecimiento Percival[™] con sistema de régimen de crecimiento a 25 ° c, fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuras durante 5 días de la germinación.

Pretratamiento En el día 5, los segmentos del hipocótilo de unos 3 mm de longitud son suprimidos asépticamente, se descartan las secciones restantes de la raíz y disparar (secado de segmentos del hipocótilo es prevenido por sumergir los segmentos hipocotilos en 10 mL de estéril milliQ[™] agua durante el proceso de supresión). Los segmentos del hipocótilo se colocan horizontalmente sobre papel de filtro estéril en medio de la inducción de callos, MSK1D1 (MS, cinetina 1 mg/L, 1 mg/L 2, 4-D, 3.0% de sacarosa, 0.7% phytagar) para el tratamiento previo de 3 días en un crecimiento de Percival[™] de cámara con régimen de crecimiento de 22-23 ° C y un fotoperíodo de 16 horas luz, oscuros 8 horas.

Co-Cultivo con Agrobacterium: El día antes de Agrobacterium cultivo Co, frascos de medio YEP con los antibióticos apropiados, son inoculadas con la cepa de Agrobacterium que contiene el plásmido binario. Segmentos del hipocótilo son transferidos de papel de filtro callo medio de inducción, MSK1D1 a un platos de Petri[™] vacío 100 x 25 mm que contenga 10 mL de líquido M-medio para evitar los segmentos del hipocótilo se seque. Una espátula se utiliza en esta etapa para recoger a los segmentos y transferir los

segmentos al nuevo medio. El líquido que m-medio se retira con una pipeta y 40 mL de suspensión de *Agrobacterium* se agrega a la placa de Petri [™] (500 segmentos con 40 mL de solución de *Agrobacterium*). Los segmentos del hipocótilo son

5 tratados durante 30 minutos con remolinos periódica del plato Petri [™] para que los segmentos del hipocótilo queden inmersos en la solución de *Agrobacterium*. Al final del período de tratamiento, la solución de *Agrobacterium* se pipetea en un vaso de residuos; autoclave y descartadas (la solución de

10 *Agrobacterium* se retira completamente para evitar la proliferación de *Agrobacterium*). Se transfieren los hipocotilos tratadas con pinzas a las láminas originales que contienen medios MSK1D1 con papel de filtro (cuidado para asegurarse de que los segmentos no se secó). El hipocótilo

15 transformada segmentos y control no-transformado del hipocótilo segmentos son devueltos a la cámara de crecimiento Percival [™] bajo luz de intensidad reducida (por cubriendo las placas con papel de aluminio), y los segmentos tratados hipocotilo se cultivan conjuntamente con *Agrobacterium*

20 durante 3 días.

Inducción de callos en medio de selección: Después de 3 días de cultivo Co, los segmentos del hipocótilo se transfieren individualmente con fórceps en medio de la inducción de callos, MSK1D1H1 (MS, cinetina 1 mg/L, 1 mg/L 2, 4-D, 0,5 gm/L MES, 5 mg/L AgNO₃, 300 mg/L Timentin [™],

25 carbenicilina 200 mg/L, 1 mg/L Herbiace [™], 3% de sacarosa, phytagar 0.7%) con régimen de crecimiento fijado en 22-26 °

c. Los segmentos del hipocótilo están anclados en el medio pero no están profundamente arraigados en el medio.

Selección y regeneración de brote: Después de 7 días en medio de la inducción de callos, los segmentos del hipocótilo callusing se transfieren a disparar regeneración medio 1 con la selección, MSB3Z1H1 (MS, 3 mg/L BAP, zeatina 1 mg/L, 0,5 gm/L MES, 5 mg/L AgNO₃, 300 mg/L Timentin [™], carbenicilina 200 mg/L, 1 mg/L Herbiace [™], 3% de sacarosa, phytagar 0.7%). Después de 14 días, los segmentos del hipocótilo que desarrollan brotes son transferidos a la regeneración media 2 con la selección mayor, MSB3Z1H3 (MS, 3 mg/L BAP 1 mg/L zeatina, MES, 5 mg/L AgNO₃, 300 mg/l 0,5 gm/L Timentin [™], carbenicilina 200 mg/L, 3 mg/L Herbiace [™], 3% de sacarosa, phytagar 0.7%) con régimen de crecimiento fijado en 22-26 ° c.

Sesión de elongación: Después de 14 días, los segmentos del hipocótilo que desarrollan brotes son transferidos de regeneración media 2 a disparar medio de alargamiento, MSMESH5 (MS, 300 mg/L Timentin [™], 5 mg/l Herbiace [™], 2% de sacarosa, 0.7% TC Agar) con régimen de crecimiento fijado en 22-26 ° c. Brotes que son alargados ya fueron aisladas de los segmentos del hipocótilo y transfirieron a MSMESH5. Después de 14 días los brotes restantes que no han alargado en la cadenaaa ronda de cultivo en el medio de alargamiento de disparar se transfieren a medio fresco disparar alargamiento, MSMESH5. En esta etapa se descartan todos los segmentos del hipocótilo restantes que no

producen brotes.

Inducción de raíz: Después de 14 días de cultivo en el medio de alargamiento de disparar, los brotes aislados se transfieren a medio MSMEST (MS, 0.5g/L MES, 300 mg/L Timentin [™], 2% de sacarosa, 0.7% TC Agar) para la inducción de raíz entre 22 y 26 ° C. Cualquier brotes que no producen raíces después de la incubación en la cadena transferencia a medio MSMEST se transfieren a una segunda o tercera ronda de incubación en medio MSMEST hasta que los brotes desarrollan raíces.

Análisis por PCR: Segmentos de hipocotilo canola transformados que se regeneró en brotes que comprende las raíces más se analizan mediante un ensayo PCR confirmación molecular. Tejido foliar es obtenida de los brotes verdes y probado mediante PCR para detectar la presencia del gen marcador seleccionable pat. Cualquier cloróticas brotes son descartados y no sometidos a análisis por PCR. Las muestras que se identifican como positivo para la presencia del gen marcador seleccionable pat se guardan y cultivadas en medio MSMEST para continuar el desarrollo y alargamiento de los brotes y raíces. Las muestras que se identifican como que no contienen el gen marcador seleccionable pat negativo según análisis de PCR se descartan.

Las plantas de canola transformadas compuesto por brotes y raíces que son positivos PCR para detectar la presencia del gen marcador seleccionable pat se trasplantan en tierra en un invernadero. Después del establecimiento de

las plantas de canola dentro del suelo, las plantas de colza se analizan más para cuantificar el número de copias del cassette expresión génica pat mediante un ensayo PCR cuantitativa invasor [™] y Southern blot. Las plantas transgénicas de canola T₀ que están confirmadas para contener al menos una copia del casete de expresión génica pat son avanzadas para su posterior análisis de la semilla. Las semillas obtenidas de plantas de colza T₀ transgénicas tesis, es decir, T₁ semillas de canola, se analizan para detectar la presencia del gen objetivo.

Si bien la presente descripción puede ser susceptible de diversas modificaciones y formas alternativas, las modalidades que se describieron anteriormente se han mostrado sólo a modo de ejemplo detallado. Sin embargo, cabe comprender que la presente descripción no debe verse limitada a las modalidades particulares que se describen en el presente. En cambio, la presente descripción cubre todos los equivalentes, modificaciones y alternativas que se encuadren dentro del alcance de la presente descripción, tal como se define a través las siguientes reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes legales.

REIVINDICACIONES

5

1. Un ARN que comprende por al menos 15 nucleótidos contiguos que tienen, en toda su longitud, al menos un 80% de identidad a una secuencia de ADN de codificación de por lo menos una porción de rnapII-140.

10

2. El ARN de conformidad con la reivindicación 1, en donde ARN comprende una raíz y un bucle.

3. El ARN de conformidad con la reivindicación 1, en el cual el ácido nucleico comprende además una secuencia complementaria de al menos los nucleótidos contiguos 15.

15

4. El ARN de conformidad con la reivindicación 2, donde al menos una porción de tallo del bucle del tallo de ARN expresado está formado por el enlace de al menos 15 nucleótidos contiguos a la secuencia complementaria a al menos 15 nucleótidos contiguos.

20

5. El ARN de conformidad con la reivindicación 1, en el cual el ARN es un ARNi

6. El ARN de conformidad con la reivindicación 5, en el cual el ARNi es un ARNds, ARNsi, ARNmi o un ARNhp.

25

7. El ARN de conformidad con la reivindicación 1, en el cual el ARN se compone de un análogo del ácido nucleico.

8. El ARN de conformidad con la reivindicación 1,

en el cual el ARN es capaz de inhibir la expresión de RNAPII-140 en un coleóptero.

9. El ARN de conformidad con la reivindicación 8, en el cual la inhibición de la expresión de RNAPII-140 es a través de silenciamiento del gen post-transcripcional.

10. El ARN de conformidad con la reivindicación 1, en el cual el rnapII-140 es *Diabrotica virgifera virgifera* rnapII-140

11. El ARN de conformidad con la reivindicación 1, en donde el rnapII-140 se codifica por SEQ ID NO: 1.

12. El ARN de conformidad con la reivindicación 1, en donde el rnapII-140 es un *Meligethes* rnapII-140.

13. El ARN de conformidad con la reivindicación 1, en el cual rnapII-140 se codifica por un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO: 73, 75 y 81.

14. El ARN de conformidad con la reivindicación 1, en el cual la secuencia que codifica por lo menos una porción de rnapII-140 se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID: 3, 4, 5, y 77.

15. El ARN de conformidad con la reivindicación 1 donde los nucleótidos contiguos al menos 15 es seleccionado del grupo que consta de 19, 21, 25, 29, 30, 40, 50, 70 y 100 nucleótidos contiguos.

16. El ARN de conformidad con la reivindicación 1, en donde por lo menos 80% de identidad se selecciona del grupo que consiste de la identidad de 85%, 90%, 95% y 100%.

17. Una célula de la planta que comprende el ARN de conformidad con la reivindicación 1.

18. La célula de la planta de conformidad con la reivindicación 15, en el cual la planta se seleccionó del grupo que consiste de Zea mays, Glycine max, Brassica spp, y la familia Poaceae.

19. Un ácido nucleico que codifica el ARN de conformidad con la reivindicación 1.

20. El ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 17, en el cual el ácido nucleico se compone de una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID Nos: 16, 17, 78 y 79.

21. El ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 17, en el cual el ácido nucleico está vinculado de manera operable a un promotor.

22. Un vector que comprende el ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 17.

23. Una célula de la planta que comprende el ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 17.

24. La célula de la planta de conformidad con la reivindicación 21, en el cual la planta se seleccionó del grupo que consiste de Zea mays, Glycine max, Brassica spp, y la familia Poaceae.

25. La célula de la planta de conformidad con la reivindicación 21, en el cual el ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 17 se integra en el genoma de la célula de la planta.

26. Un método de control de coleópteros, el método que comprende expresando el ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 17 en una planta.

27. El método de conformidad con la reivindicación 5 24, en donde el coleóptero se selecciona del grupo que consiste de *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica barberi*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Diabrotica virgifera zea*, aparece *Diabrotica balteata*, *Diabrotica undecimpunctata tenella*, *Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata*, y *Meligethes aeneus*. 10

28. Una fuente de alimento para un coleopterán que comprende el ARN de conformidad con la reivindicación 1.

29. Un método para controlar los coleopteranes, el método que comprende alimentar un coleopterán la fuente de 15 alimentación de conformidad con la reivindicación 26.

30. El método de conformidad con la reivindicación 24, que comprende además la expresión de un ácido nucleico que codifica una proteína de *Bacillus thuringiensis* de insecticida.

20 31. El método de conformidad con la reivindicación 28, en el que la proteína de *Bacillus thuringiensis* toxina se selecciona del grupo que consiste en, Cry35Ab1, Cry34/35Ab10, Cry3A, Cry3B, Cry6A, y combinaciones de los mismos.

25 32. El método de conformidad con la reivindicación 24, que comprende además la expresión de un ácido nucleico que codifica un ARNi que inhibe la expresión de un gen de coleópteros.

33. El método de conformidad con la reivindicación 30, en el que el ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste de caf1 180, VatpaseC, Rho1, VatpaseH, PPI 87B, RPA7, y RPS6.

5

10

15

20

25

ASSIGNMENT BY INVENTORS

THIS ASSIGNMENT, made effective this 20th day of December, 2013, by Andreas Vilcinskas and Eileen Knorr (hereinafter referred to as Assignors), residing at Winchesterstr. 2, 35394 Giessen, GERMANY; and Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, GERMANY, respectively;

WHEREAS, Assignors have invented certain new and useful improvements in RNAPII-140 NUCLEIC ACID MOLECULES THAT CONFER RESISTANCE TO COLEOPTERAN PESTS, set forth in a Provisional application for Letters Patent of the United States, already filed on December 20, 2013 as U.S. Application No. 61/919,239; and

WHEREAS, Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e. V., having its principal place of business at Hansastraße 27 c, 80686 München, Federal Republic of Germany (hereinafter referred to as Assignee), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said inventions and said Application for Letters Patent of the United States, and in and to any Letters Patent of the United States to be obtained therefore and thereon.

NOW, for good and valuable consideration and/or the remuneration received for my/our work and/or other goods and sufficient consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, transferred and set over, and by these presents do sell, assign, transfer and set over, unto Assignee, its successors, legal representatives and assigns, the entire right, title and interest in and to the above-mentioned inventions and application for Letters Patent, and in and to any and all direct and indirect divisions, continuations and continuations-in-part of said application, and any and all Letters Patent in the United States and all foreign countries which may be granted therefore and thereon, and reissues, reexaminations and extensions of said Letters Patent, and all rights under the International Convention for the Protection of Industrial Property, the same to be held and enjoyed by Assignee, for its own use and benefit and the use and benefit of its successors, legal representatives and assigns, to the full end of the term or terms for which Letters Patent may be granted and/or extended, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors, had this sale and assignment not been made.

AND for the same consideration, Assignors hereby represent and warrant to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that, at the time of execution and delivery of these presents, except for any rights, titles and/or interests that have arisen to Assignee under law or that have already been transferred to Assignee, Assignors are the sole and lawful owners of the entire right, title and interest in and to the said inventions and application for Letters Patent above-mentioned, and that the same are unencumbered and that Assignors have good and full right and lawful authority to sell and convey the same in the manner herein set forth.

AND for the same consideration, Assignors hereby covenant and agree to and with Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that Assignors will sign all papers and documents, take all lawful oaths and do all acts necessary or required to be done for the procurement, maintenance, enforcement and defense of any Letters Patent and applications for Letters Patent for said inventions, without charge to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, whenever counsel of Assignee, or counsel of its successors, legal representatives and assigns, shall advise: that any proceeding in connection with said inventions, or said Provisional application for Letters Patent, or any proceeding in connection with any Letters Patent or applications for Letters Patent for said inventions in any country, including but not limited to interference proceedings, is lawful and desirable; or, that any division, continuation or continuation-in-part of any application for Letters Patent, or any reissue, reexamination or extension of any Letters Patent, to be obtained thereon, is lawful and desirable.

AND Assignors hereby request the Commissioner for Patents and Trademarks to issue said Letters Patent of the United States to Assignee, as Assignee of said inventions and the Letters Patent to be issued thereon, for the sole use and benefit of Assignee, its successors, legal representatives and assigns.

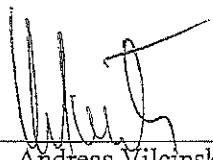
AND Assignors hereby grant the following individuals the power to insert on this Assignment any further identification which may be necessary or desirable in order to comply with the rules of the United States Patent and Trademark Office for recordation of this document:

Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e. V.

All practitioners at Customer Number 80834

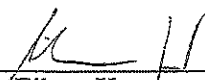
AND Assignors acknowledge an obligation of assignment of this invention to Assignee at the time the invention was made.

Date: 22. 1. 2015

Signature: 

Andreas Vilcinskas

Date: 22.1.2015

Signature: 
Eileen Knorr

This Form 881 is in the **ENGLISH** language and has the same meaning in other languages with the same 881 number.

CESIÓN DE INVENTORES

LA PRESENTE CESIÓN, efectiva este día 20 de diciembre de 2013 por Andreas Vilcinskis y Eileen Knorr (conocidos en adelante como Cedentes), domiciliados en Winchesterstr. 2, 35394 Giessen, ALEMANIA; y Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, ALEMANIA, respectivamente;

CONSIDERANDO QUE, los cedentes han inventado una serie de mejoras nuevas y útiles en MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO RNAPII 140 QUE CONFIEREN RESISTENCIA A PLAGAS DE COLEÓPTEROS, establecidas en una solicitud Provisional para Títulos Patente de los Estados Unidos, ya presentadas el 20 de diciembre de 2013 como la solicitud de EE.UU. No. 61/919,239; y

CONSIDERANDO QUE, Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V., cuya sede principal se encuentra ubicada en Hansastraße 27 c, 80686 München, República Federal de Alemania (conocida en adelante como Cesionario), está interesada en adquirir todos los derechos, títulos, e intereses en y sobre dichas invenciones y dicha Solicitud para Títulos Patente de los Estados Unidos, y en relación a todos y cada uno de los Títulos Patente de los Estados Unidos que se obtengan a partir de y en relación con las mismas.

EN VIRTUD DE LO ANTERIOR, por contraprestación válida y onerosa y/o remuneración recibida por mi/nuestro trabajo y/o por otras contraprestaciones válidas y suficientes, cuyo recibo se reconoce por la presente, los Cedentes han vendido, cedido, transferido y traspasado, y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, la totalidad de los derechos, títulos e intereses en relación a todas y cada una de las invenciones anteriormente mencionadas y la solicitud para Títulos Patente, y en relación a todas y cada una de las divisiones, continuaciones y continuaciones parciales directas e indirectas de dicha solicitud, y todos y cada uno de los Títulos Patente en los Estados Unidos y todos los países extranjeros que se obtengan a partir de y en relación a las mismas, y las reemisiones, reexaminaciones y extensiones de dichos Títulos Patente, así como todos los derechos de acuerdo a la Convención Internacional para la Protección de Propiedad Industrial, con los cuales también contará y gozará el Cesionario, para su propio uso y disfrute y para el uso y disfrute de sus sucesores, representantes legales y cesionarios, durante todo el término o términos de los Títulos Patente otorgados y/o extendidos, de la misma manera y por el mismo tiempo que tendrían y disfrutarían los Cedentes si no hubiese ocurrido la presente venta y cesión.

Y por la misma consideración, por medio de la presente los Cedentes declaran y garantizan al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios que, en el momento de ejecución y entrega del presente documento, a excepción de los derechos, títulos y/o intereses surgidos para el Cesionario conforme a la ley o que ya han sido transferidos al Cesionario, los Cedentes son los únicos y legítimos propietarios de la totalidad de los derechos, títulos e intereses relacionados a dichas invenciones y solicitud de Títulos Patente mencionados anteriormente, y que los mismos se encuentran libres de

gravámenes y que los Cedentes están en todo su derecho y están autorizados a vender y traspasar los mismos de la manera establecida en este instrumento.

Y por la misma consideración, por medio de la presente los Cedentes aceptan y se comprometen con el Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, a firmar todos los papeles y documentos, a prestar todos los juramentos correspondientes y hacer todo lo necesario o exigido para obtener, mantener, hacer cumplir y defender cualquiera de los Títulos Patente y solicitudes para Títulos Patente para dichas invenciones, sin ningún cargo al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, toda vez que el apoderado del Cesionario, o el apoderado de sus sucesores, representantes legales y cesionarios indiquen: que algún procedimiento relacionado a dichas invenciones, o dicha solicitud Provisional de Títulos Patente, o cualquier procedimiento relacionado a cualquier Título Patente o solicitudes para Títulos Patente para dichas invenciones en cualquier país, incluyendo mas no limitado a procedimientos de interferencia, es legítimo y deseable; o que cualquier división, continuación o continuación parcial de cualquier solicitud para Títulos Patente, o cualquier reemisión, reexaminación o extensión de cualquier Título Patente que se obtenga como resultado de las mismas es legítima y deseable.

Y por medio de la presente los Cedentes solicitan al Comisionado de Marcas y Patentes expedir dichos Títulos Patente de los Estados Unidos al Cesionario, como Cesionario de dichas invenciones y de los Títulos Patente que se obtengan como resultado de las mismas, para el uso y beneficio exclusivo del Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios.

Y por medio de la presente los Cedentes autorizan a los siguientes individuos a adjuntar al presente documento de Cesión, cualquier tipo de identificación adicional que sea necesario o deseable para cumplir con las normas de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos para el registro de este documento:

Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V.

Todos los profesionales con el Número de Cliente 80834

Y los Cedentes reconocen una obligación de cesión de esta invención al Cesionario en el momento en que se realizó la invención.

Fecha: 22/01/2015

Firma: [firma ilegible]
Andreas Vilcinskas

**TESTIGO FIRMANTE
JURAMENTO DE EJECUCIÓN
DE UNA CESIÓN**

Yo, [nombre ilegible]

Cuya dirección de oficina de correos completa es:

[dirección ilegible]

Juro y digo que estaba presente personalmente y presencié a:

Andreas Vilcinskas

A quien conozco o identifico como el inventor(s) nombrado en la cesión adjunta, firmar y ejecutar la presente cesión para los fines indicados en la misma.

Firmado en: [lugar ilegible]

Este día 22 de enero de 2015

[firma ilegible]
Testigo firmante

Fecha: 22/01/2015

Firma: [firma ilegible]
Eileen Knorr

**TESTIGO FIRMANTE
JURAMENTO DE EJECUCIÓN
DE UNA CESIÓN**

Yo, [nombre ilegible]

Cuya dirección de oficina de correos completa es:

[dirección ilegible]

Juro y digo que estaba presente personalmente y presencié a:

Eileen Knorr

A quien conozco o identifico como el inventor(s) nombrado en la cesión adjunta, firmar y ejecutar la presente cesión para los fines indicados en la misma.

Firmado en: [lugar ilegible]

Este día 22 de enero de ____

[firma ilegible]

Testigo firmante

HRN\HRN\ID-454074\WPC22899

ASSIGNMENT BY INVENTORS

THIS ASSIGNMENT, made effective this 20th day of December, 2013, by Kenneth Narva; Kanika Arora; Murugesan Rangasamy; Balaji Veeramani; Premchand Gandra; Sarah E. Worden; and Huarong Li (hereinafter referred to as Assignors), residing at 4372 Creekside Pass, Zionsville, Indiana 46077; 2903 Spring Meadow Ct, Indianapolis, Indiana 46268; 6087 Chesnut Eagle Drive, Zionsville, Indiana 46077; 8815 Arborway Court, Apt 124, Indianapolis, Indiana 46268; 2009 Norcross Cr, Apt D, Indianapolis, Indiana 46260; 8435 Stones Ferry Road, Indianapolis, Indiana 46278; and 6203 Eagle Lake Drive, Zionsville, 46077, respectively;

WHEREAS, Assignors have invented certain new and useful improvements in RNAPII-140 NUCLEIC ACID MOLECULES THAT CONFER RESISTANCE TO

COLEOPTERAN PESTS, set forth in a Provisional application for Letters Patent of the United States, already filed on December 20, 2013 as U.S. Application No. 61/919,239; and

WHEREAS, Dow AgroSciences LLC, a Limited Liability Company organized under and pursuant to the laws of Delaware having its principal place of business at 9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268 (hereinafter referred to as Assignee), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said inventions and said Application for Letters Patent of the United States, and in and to any Letters Patent of the United States to be obtained therefore and thereon.

NOW, for good and valuable consideration and/or the remuneration received for my/our work and/or other goods and sufficient consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, transferred and set over, and by these presents do sell, assign, transfer and set over, unto Assignee, its successors, legal representatives and assigns, the entire right, title and interest in and to the above-mentioned inventions and application for Letters Patent, and in and to any and all direct and indirect divisions, continuations and continuations-in-part of said application, and any and all Letters Patent in the United States and all foreign countries which may be granted therefore and thereon, and reissues, reexaminations and extensions of said Letters Patent, and all rights under the International Convention for the Protection of Industrial Property, the same to be held and

enjoyed by Assignee, for its own use and benefit and the use and benefit of its successors, legal representatives and assigns, to the full end of the term or terms for which Letters Patent may be granted and/or extended, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors, had this sale and assignment not been made.

AND for the same consideration, Assignors hereby represent and warrant to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that, at the time of execution and delivery of these presents, except for any rights, titles and/or interests that have arisen to Assignee under law or that have already been transferred to Assignee, Assignors are the sole and lawful owners of the entire right, title and interest in and to the said inventions and application for Letters Patent above-mentioned, and that the same are unencumbered and that Assignors have good and full right and lawful authority to sell and convey the same in the manner herein set forth.

AND for the same consideration, Assignors hereby covenant and agree to and with Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that Assignors will sign all papers and documents, take all lawful oaths and do all acts necessary or required to be done for the procurement, maintenance, enforcement and defense of any Letters Patent and applications for Letters Patent for said inventions, without charge to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, whenever counsel of Assignee, or counsel of its successors, legal representatives and assigns, shall advise: that any proceeding in connection with said inventions, or said Provisional application for Letters Patent, or any proceeding in connection with any Letters Patent or applications for Letters Patent for said inventions in any country, including but not limited to interference proceedings, is lawful and desirable; or, that any division, continuation or continuation-in-part of any application for Letters Patent, or any reissue, reexamination or extension of any Letters Patent, to be obtained thereon, is lawful and desirable.

AND Assignors hereby request the Commissioner for Patents and Trademarks to issue said Letters Patent of the United States to Assignee, as Assignee of said inventions and the Letters Patent to be issued thereon, for the sole use and benefit of Assignee, its successors, legal representatives and assigns.

AND Assignors hereby grant the following individuals the power to insert on this Assignment any further identification which may be necessary or desirable in order to comply with the rules of the United States Patent and Trademark Office for recordation of this document:

DOW AGROSCIENCES LLC

All practitioners at Customer Number 25212

AND Assignors acknowledge an obligation of assignment of this invention to Assignee at the time the invention was made.

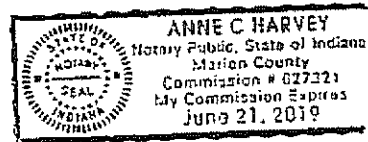
Kenneth Narva
Kenneth Narva

Date: 2 / 13 / 14

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 13 day of February, 2014, before me
personally came Kenneth Narva, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Anne C Harvey
Notary Public



Kanika Arora

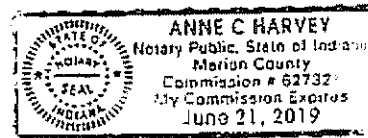
Kanika Arora

Date: 02/13/2014

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 13 day of February, 2014, before me
personally came Kanika Arora, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Anne C Harvey
Notary Public



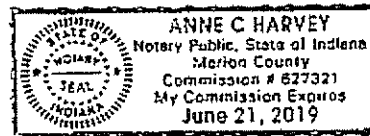
Murugesan R

Date: March 6, 2014

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 16 day of March, 2014, before me personally came Murugesan Rangasamy, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Anne Chang
Notary Public



V. Balaji

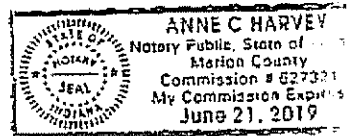
Balaji Veeramani

Date: 2/13/2013

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 13 day of February, 2014, before me
personally came Balaji Veeramani, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Anne C Harvey
Notary Public





Premchand Gandra

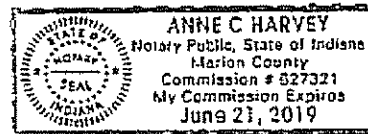
Date: 02/13/14

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 13 day of February, 2014, before me
personally came Premchand Gandra, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.



Notary Public



Sarah E Worden

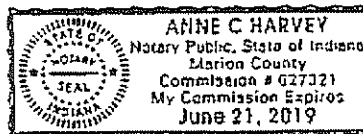
Sarah E. Worden

Date: 02/13/2014

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 13 day of February, 2014, before me
personally came Sarah E. Worden, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Anne C Harvey
Notary Public



Huarong Li

Huarong Li

Date: 2/13/2014

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 13 day of February, 2014, before me
personally came Huarong Li, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Anne C Harvey
Notary Public



CESIÓN DE INVENTORES

LA PRESENTE CESIÓN, efectiva este día 20 de diciembre de 2013 por Kenneth Narva; Kanika Arora; Murugesan Rangasamy; Balaji Veeramani; Premchand Gandra; Sarah E. Worden; y Huarong Li (en adelante conocidos como Cedentes), domiciliados en 4372 Creekside Pass, Zionsville, Indiana 46077; 2903 Spring Meadow Ct, Indianápolis, Indiana 46268; 6087 Chesnut Eagle Drive, Zionsville, Indiana 46077; 8815 Arborway Court, Apt 124, Indianápolis, Indiana 46268; 2009 Norcross Cr, Apt D, Indianapolis, Indiana 46260; 8435 Stones Ferry Road, Indianápolis, Indiana 46278; y 6203 Eagle Lake Drive, Zionsville, 46077, respectivamente;

CONSIDERANDO QUE, los cedentes han inventado una serie de mejoras nuevas y útiles en MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO RNAPII 140 QUE CONFIEREN RESISTENCIA A PLAGAS DE COLEÓPTEROS, establecidas en una solicitud Provisional para Títulos Patente de los Estados Unidos, ya presentadas el 20 de diciembre de 2013 como la solicitud de EE.UU. No. 61/919,239; y

CONSIDERANDO QUE, Dow AgroScience LLC, una sociedad de responsabilidad limitada constituida bajo y conforme a las leyes de Delaware, cuya sede principal se encuentra ubicada en 9330 Zionsville Road, Indianápolis, Indiana 46268 (conocido en adelante como el Cesionario), está interesada en adquirir todos los derechos, títulos, e intereses en y sobre dichas invenciones y dicha Solicitud de Títulos Patente de los Estados Unidos, y en relación a todos y cada uno de los Títulos Patente de los Estados Unidos que se obtengan a partir de y en relación con las mismas.

EN VIRTUD DE LO ANTERIOR, por contraprestación válida y onerosa y/o remuneración recibida por mi/nuestro trabajo y/o por otras contraprestaciones válidas y suficientes, cuyo recibo se reconoce por la presente, los Cedentes han vendido, cedido, transferido y traspasado, y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, la totalidad de los derechos, títulos e intereses en relación a todas y cada una de las invenciones anteriormente mencionadas y la solicitud para Títulos Patente, y en relación a todas y cada una de las divisiones, continuaciones y continuaciones parciales directas e indirectas de dicha solicitud, y todos y cada uno de los Títulos Patente en los Estados Unidos y todos los países extranjeros que se obtengan a partir de y en relación a las mismas, y las reemisiones, reexaminaciones y extensiones de dichos Títulos Patente, así como todos los derechos de acuerdo a la Convención Internacional para la Protección de Propiedad Industrial, con los cuales también contará y gozará el Cesionario, para su propio uso y disfrute y para el uso y disfrute de sus sucesores, representantes legales y cesionarios, durante todo el término o términos de los Títulos Patente otorgados y/o extendidos, de la misma manera y por el mismo tiempo que tendrían y disfrutarían los Cedentes si no hubiese ocurrido la presente venta y cesión.

Y por la misma consideración, por medio de la presente los Cedentes declaran y garantizan al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios que, en el momento de ejecución y entrega del presente documento, a excepción de los derechos,

títulos y/o intereses surgidos para el Cesionario conforme a la ley o que ya han sido transferidos al Cesionario, los Cedentes son los únicos y legítimos propietarios de la totalidad de los derechos, títulos e intereses relacionados a dichas invenciones y solicitud de Títulos Patente mencionados anteriormente, y que los mismos se encuentran libres de gravámenes y que los Cedentes están en todo su derecho y están autorizados a vender y traspasar los mismos de la manera establecida en este instrumento.

Y por la misma consideración, por medio de la presente los Cedentes aceptan y se comprometen con el Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, a firmar todos los papeles y documentos, a prestar todos los juramentos correspondientes y hacer todo lo necesario o exigido para obtener, mantener, hacer cumplir y defender cualquiera de los Títulos Patente y solicitudes para Títulos Patente para dichas invenciones, sin ningún cargo al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, toda vez que el apoderado del Cesionario, o el apoderado de sus sucesores, representantes legales y cesionarios indiquen: que algún procedimiento relacionado a dichas invenciones, o dicha solicitud Provisional de Títulos Patente, o cualquier procedimiento relacionado a cualquier Título Patente o solicitudes para Títulos Patente para dichas invenciones en cualquier país, incluyendo mas no limitado a procedimientos de interferencia, es legítimo y deseable; o que cualquier división, continuación o continuación parcial de cualquier solicitud para Títulos Patente, o cualquier reemisión, reexaminación o extensión de cualquier Título Patente que se obtenga como resultado de las mismas es legítima y deseable.

Y por medio de la presente los Cedentes solicitan al Comisionado de Marcas y Patentes expedir dichos Títulos Patente de los Estados Unidos al Cesionario, como Cesionario de dichas invenciones y de los Títulos Patente que se obtengan como resultado de las mismas, para el uso y beneficio exclusivo del Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios.

Y por medio de la presente los Cedentes autorizan a los siguientes individuos a adjuntar al presente documento de Cesión, cualquier tipo de identificación adicional que sea necesario o deseable para cumplir con las normas de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos para el registro de este documento:

DOW AGROSCIENCES LLC

Todos los profesionales con el Número de Cliente 25212

Y los Cedentes reconocen una obligación de cesión de esta invención al Cesionario en el momento en que se realizó la invención.

Condado de Marion
Nombramiento # 627321
Mi nombramiento vence el 21 de junio de 2019

(firma ilegible)
Murugesan Rangasamy

Fecha: 06/03/2014

Estados Unidos de América)
Estado de Indiana) ss.:
Condado de Marion)

Este día 06 de marzo de 2014, compareció personalmente ante mí Murugesan Rangasamy, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(firma ilegible)
Notario Público

Sello: ANNE C. HARVEY
Notario Público, Estado de Indiana
Condado de Marion
Nombramiento # 627321
Mi nombramiento vence el 21 de junio de 2019

(firma ilegible)
Balaji Veeramani

Fecha: 13/02/2014

Estados Unidos de América)
Estado de Indiana) ss.:
Condado de Marion)

Este día 13 de febrero de 2014, compareció personalmente ante mí Balaji Veeramani, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(firma ilegible)

Notario Público

Sello: ANNE C. HARVEY
Notario Público, Estado de Indiana
Condado de Marion
Nombramiento # 627321
Mi nombramiento vence el 21 de junio de 2019

(firma ilegible)
Premchand Gandra

Fecha: 13/02/2014

Estados Unidos de América)
Estado de Indiana) ss.:
Condado de Marion)

Este día 13 de febrero de 2014, compareció personalmente ante mí Premchand Gandra, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(firma ilegible)
Notario Público

Sello: ANNE C. HARVEY
Notario Público, Estado de Indiana
Condado de Marion
Nombramiento # 627321
Mi nombramiento vence el 21 de junio de 2019

(firma ilegible)
Sarah E. Worden

Fecha: 13/02/2014

Estados Unidos de América)
Estado de Indiana) ss.:
Condado de Marion)

Este día 13 de febrero de 2014, compareció personalmente ante mí Sarah E. Worden, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(firma ilegible)

Notario Público

Sello: ANNE C. HARVEY
Notario Público, Estado de Indiana
Condado de Marion
Nombramiento # 627321
Mi nombramiento vence el 21 de junio de 2019

(firma ilegible)

Huarong Li

Fecha: 13/02/2014

Estados Unidos de América)
Estado de Indiana) ss.:
Condado de Marion)

Este día 13 de febrero de 2014, compareció personalmente ante mí Huarong Li, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(firma ilegible)

Notario Público

Sello: ANNE C. HARVEY
Notario Público, Estado de Indiana
Condado de Marion
Nombramiento # 627321
Mi nombramiento vence el 21 de junio de 2019

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª N° 72-35
BOGOTÁ, S - COLOMBIA

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we); the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)
Dow AgroSciences LLC
of/domiciliado (s) en 9330 Zionsville Road,
Indianapolis, Indiana 46268, United
States of America,

por el presente ratificamos la
presentada por
como agente oficioso ante
en

el 30 de mayo de 2007
y por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832;
GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa.
31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados
en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a
lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de
Comercio, el primero como principal y los demás como
suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en
todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para
recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o
extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al
principal en caso de ausencia o impedimento temporal o
definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el
segundo representante suplente haya de reemplazar al primero,
o el tercero al segundo. En tales casos, el representante
principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos,
declararán su intención de no ejercer la representación
mediante declaración autenticada por Notario Público en
Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul
de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento,
con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare
definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la
ausencia o impedimento del representante principal, o de su
primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la
representación, en su orden, uno u otros según el caso,
asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese
momento el ejercicio de la representación por el primero,
segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba
nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra)
propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo
efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me
(nos) representen ante cualesquiera entidades o personas,
ejercen o no jurisdicción, especialmente ante las del orden
administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como
los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los
siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención,
modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas
de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales,
nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y
denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de
nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de
licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de
competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u
observaciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad,

hereby ratify the
filed without a Power of Attorney by
before
in

one, and do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832;
GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa.
31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled
at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, in due compliance
with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the
Commercial Code, the first as principal and the others as
alternates, in the order of their appointment, as our
representatives for all industrial property matters with faculty
to receive notifications and to appoint attorneys in and out of
Court. The first alternate shall replace the principal in case of
his absence or of temporal or definitive impediment. The same
rule will apply when the second alternate representative is to
replace the first one, or when the third is to replace the first or
second alternates in their turn, or both of them, second. In such
cases, the principal representative, or the shall state their
intention not to act as representatives through a declaration
given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or
another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in
case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If
any of the appointees were to be definitely absent, the
following alternate shall take his place. When the absence or
impediment of the principal representative, or of the first or
second alternate in their turn ceases, the representation can be
taken again in their sequence, by the principal, the first or
second alternate depending on case, and the mere fact or its
exercise will suffice. The exercise of the representation by the
first, second or third alternates in their turn shall end at such
time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the
above-named attorneys-at-law so that they may obtain the
protection of my (our) industrial property and against the
unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said
attorneys to represent me (us) before any authorities or persons;
with or without jurisdiction, specially those administrative,
administrative contentious and judicial, as well as before
Arbitration Court, in all matters concerning the following: a)
Obtainment of patents, utility models and industrial designs;
the registration of trademarks, collective, defensive and service
marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal
varieties and denominations of origin; its renewal, assignment,
change of name or domicile, voluntary cancellation; and the
registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of

A la vuelta →

Over →

© CAVELIER ABOGADOS
WPPDRE-21 (MINUTA N° 12.1.12.9-USA)

medidas cautelares; concesión de licencias; la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy _____

February 6, 1998

in/en Indianapolis, Indiana 46268

United States of America

Kenneth L. Loertscher Firma

Signature
Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary
& General Patent Counsel



Señor Director

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Asunto : Solicitud de patente para **MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO RNAPII 140 QUE CONFIEREN RESISTENCIA A PLAGAS DE COLEÓPTEROS**
PCT/US2014/071583
Solicitantes : **DOW AGROSCIENCES LLC; FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E. V.**

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, mayor de edad, domiciliada en Bogotá, D.C., identificada con la cédula de ciudadanía No. 35.456.344 de Usaquén y Tarjeta Profesional de Abogado número 23.555 del Consejo Superior de la Judicatura, obrando como apoderada de **DOW AGROSCIENCES LLC**, mediante el presente escrito sustituyo el poder a **ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI**, identificado con cédula de ciudadanía No. 79.780.910 de Bogotá, y Tarjeta Profesional No. 114.908 del Consejo Superior de la Judicatura, para que en nombre de **DOW AGROSCIENCES LLC**, presente la solicitud de registro de la patente indicada en la referencia.

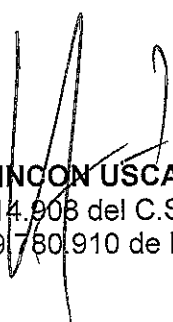
ANDRÉS RINCON USCATEGUI, queda facultado para interponer recursos, transigir, conciliar, desistir, cancelar, recibir, renunciar, sustituir y revocar las sustituciones, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Sírvase reconocerle personería en los términos y para los fines del presente mandato judicial.

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
T.P.A. No. 23.555 del C.S. de la J
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

Acepto:


ANDRES RINCON USCATEGUI
T.P.A. No. 114.908 del C.S. de la J
C.C. No. 79.780.910 de Bogotá

AML\SDC\COLO-22899-841-001-0

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel: (57-1) 347 3811 - Fax: (57-1) 211 8650 - Fax In U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 5729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731 - COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

05 FUG 076 - 111150
CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

179

5168-A
Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.

domiciliado (s) en/of Hansastrasse 27c,

München 80686,

Germany

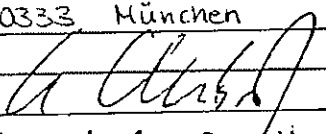
por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

76075
in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

05646086-1001C0

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseññas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 14.08.2007
en/in 80333 München
por/by 
Firma **Fraunhofer-Gesellschaft** Signature
zur Förderung der angewandten Forschung e.V.
Hansastraße 27c · 80696 München

Señor Director

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Asunto : Solicitud de patente para **MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO RNAPII 140 QUE CONFIEREN RESISTENCIA A PLAGAS DE COLEÓPTEROS**
PCT/US2014/071583
Solicitantes : **DOW AGROSCIENCES LLC; FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E. V.**

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, mayor de edad, domiciliada en Bogotá, D.C., identificada con la cédula de ciudadanía No. 35.456.344 de Usaquén y Tarjeta Profesional de Abogado número 23.555 del Consejo Superior de la Judicatura, obrando como apoderada de **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E. V.**, mediante el presente escrito sustituyo el poder a **ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI**, identificado con cédula de ciudadanía No. 79.780.910 de Bogotá, y Tarjeta Profesional No. 114.908 del Consejo Superior de la Judicatura, para que en nombre de **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E. V.**, presente la solicitud de registro de la patente indicada en la referencia.

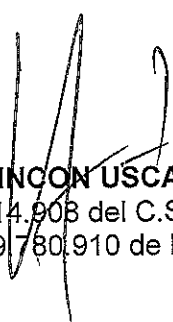
ANDRÉS RINCON USCATEGUI, queda facultado para interponer recursos, transigir, conciliar, desistir, cancelar, recibir, renunciar, sustituir y revocar las sustituciones, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Sírvase reconocerle personería en los términos y para los fines del presente mandato judicial.

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
T.P.A. No. 23.555 del C.S. de la J
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

Acepto:


ANDRES RINCON USCATEGUI
T.P.A. No. 114.908 del C.S. de la J
C.C. No. 79.780.910 de Bogotá

Listado secuencias.txt
LISTADO DE SECUENCIAS

A. DATOS DE LA SOLICITUD

(i) Solicitante: Dow AgroSciences LLC
Narva, Ken
Arora, Kanika
Rangasamy, Murugesan
Veeramani, Balajii
Gandra, Premchand
Worden, Sarah E
Li, Huarong
Vilcinskas, Andreas
Knorr, Eileen

(ii) Título de la invención: MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO DE RNAPII

(iii) Referencia del solicitante 74949-US-PSP

C. Número de secuencias 82

D. Formato legible en computadora: PatentIn version 3.5

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 1

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 3745

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Diabrotica virgiferifera

SECUENCIA SEQ ID No: 1

cggactgtca aagtcaaagt tcaaagcgtc aaaactaaaa tttgctagcg tcaaaactaa	60
aatcaaaatc ggcaaacatc tgcacgaaaa tagagttgtg cttctatatatt tattttgtaa	120
ttttgagtac cataatatac taagatgtat gatcaagaag atgatcaatt tgacgatgaa	180
gatacagaag aaatcagtgga agaactctgg caggaagcct gctggattgt tattaatgcc	240
tactttgatg aaaaagggtt ggtacggcag cagttggata gttttgatga attcattcaa	300
atgtctgtac agaggatcgt tgaagattcc ccacagatag atctacaagc agaagcgcag	360
catacatctg gggaaatcga aacccacact cgatattttgc tgaagtttga acagatctat	420
ctttcaaaac ctacccattg ggagaaagac ggtgccccat ctcttatgat gcctaataa	480
gctagattaa gaaatttgac ttattctgct cctctttatg tagatataac aaaaacaatt	540
gtgaaagaag gagaggatcc tatagaaact caacatcaga aaacttttat aggtaaaatt	600
cccattatgt tgaggatcaac atactgtctg ctcagtggat taacagatcg tgatttaaca	660
gaattaaacg agtgtccctt agatcctggc ggatatttca taattaacgg ttctgaaaaa	720
gtattaattg ctcaagagaa gatggcaact aacacagtat atgtattttc aatgaaagac	780
ggaaaatatg cgtacaaatc tgaaataaga tcttgtcttg agcacagctc tcggccaaca	840
tcaactctgt gggtaaatat gatggctcgt ggtggccagg ccatcaaaaa agctgctatt	900

Listado secuencias.txt

ggtcaacgta ttatagctat tcttccatac atcaaacaag agatccctat aatgatagtt	960
ttcagagctt tagggtttgt agcagacaga gatattctag aacacattat ttacgatttc	1020
gacgatccag aattgatgga aatggtaaaa ccttcgttag atgaagcttt cgtaattcag	1080
gaacagaata ttgctttgaa ttccatcgga gcgagagggtg ccaggccggg agtaactaaa	1140
gaaaagcgtg tgaaatatgc tagagaaatt ttacaaaagg aaatgttgcc tcatgttggt	1200
gtatccgatt ttgtgagac taaaaaagct ttttttcttg gatatatggt acatcgactt	1260
ttgctggctg cactcggacg tcgagagtta gatgacagag atcactacgg aaataagaga	1320
ctcgatttgg ctggaccatt attggctttc ctcttcagag ggcttttcaa gaacctaatg	1380
aaagaagttc gtatgtatgc ccagaagttt atcgatagag gcaaagattt caatctggat	1440
ctggccatca aaaccaaact aataacggac ggtctgaggt attctctcgc tactggaaac	1500
tggggtgacc agaaaaaagc ccatcaagca agagctggcg tgtcccaggt attgaatcgt	1560
ctaactttcg catcgacgtt gtcacattta aggcgtgtca attctccaat tggacgagac	1620
ggtaaactag ccaagcctcg acagttgcat aatacgttgt ggggaatgat ttgccctgct	1680
gaaactccag aagggtgctgc tgtaggactt gtaaaaaatc ttgctctgat ggcttatatt	1740
tccgtcgggtt cccaaccatc gccaattttg gagttcttgagg aggttggtc catggaaaac	1800
ttggaagaaa tagcgccatc tgcaattgct aacgctacca aaatctttgt gaatggttgt	1860
tgggtgggaa ttcacagaga ccctgaacaa cttatggcga cactgcgtaa acttcgacgt	1920
caaatggaca tcatcgatc agaagtatcg atgattcgag atattcgtga cagagaaata	1980
agaatttaca cagacgccgg aagaatctgt agacctttgt taatcgtcga aaatggccag	2040
ttgctattga agaaaagaca tattgatatg ttaaaagaaa gagaatataa taattatggt	2100
tggcaggtac tggctcgcgtc tgggtgtggtg gagtacatag acaccttaga agaagaaacc	2160
gtaatgattg ccatgaacct cgaagattta cgccaagaca aagaatgcgc ttattgtaca	2220
acatacactc atttgtgaaat tcatccagcc atgatttttag gagtttgccg tccatcatt	2280
ccgttcccag atcacaacca gagtcccaga aacacctatc aaagtgctat gggtaaaca	2340
gccatgggtg tctatatcac aaacttccac gttagaatgg acacactggc ccacgtcctg	2400
tactatccac ataaacctct ggtaacgaca agatctatgg agtatcttag attcagagag	2460
ttaccggctg gaatcaatag tatcgttgcg attgcttggt atacaggata caatcaggaa	2520
gattctgtta tcttgaatgc ttctgcagta gaaagaggat ttttcagatc tgtgttttac	2580
cggctttata aagacgccga atccaaacgt ataggagacc aggaagaaca attcgaaaaa	2640

Listado secuencias.txt

ccgacaagac agacgtgccca gggcatgagg aatgcccttt acgataaatt agacgacgac	2700
ggactgatat ctccaggtat tcgtgtgtct ggagacgatg tagttatagg aaaaactatg	2760
acgctaccag aaacagatga cgagttggat ggaactacaa aacgggtactc caagagagac	2820
gcatcaacat ttttgcgtaa cagtgaaact ggagttgttg atcaagtgat gttaacgcta	2880
aattcagaag gatataagtt ttgtaagata aggggtgagat ctgtgaggat accacaaatt	2940
ggagacaagt tcgcgctctag gcacggacaa aagggaacgt gcggtataca ataccgtcaa	3000
gaggatatga ttttttagtgc tgaaggtatt actccagaca ttatcatcaa tcctcacgct	3060
atccccctccc gtatgacgat tggtcacttg atcgagtgc tccaaggtaa ggtatcatcc	3120
aataaaggag aaatcgggtga tgctacacct ttcaacgatg ccgtcaacgt acagaaaatc	3180
tccactttgt tacaagaata tggttatcaa ctgagaggca acgaagtaat gtacaacggc	3240
cacactggac gtaagataaa tgctcagatt ttcttaggac ctacttacta tcaaagattg	3300
aagcacatgg tggacgataa gatccattca agagctagag gaccgttgca gattctcgtc	3360
agacagccta tggaggggtcg tgcaagagac ggtgggtctac gtttcgggtga gatggaacga	3420
gattgtcaaa tttcacacgg tgctgcacaa ttcttaagag agaggctgtt tgaagtttct	3480
gacccctata gaatccatat ttgcaacttc tgtggtttga tagctatcgc caatttgcgt	3540
aacaacacct ttgaatgtaa gggttgcaaa aataagacgc agatatcgca agttagactg	3600
ccttatgctg cgaaattact gttccaagag ctaatgtcga tgaatatagc gccgagactt	3660
atgggtactgt agtgttttaa gtaataaaaat aaatgtcctt atttaagagt attttatatt	3720
gaaataaaca ataaaattat aaaaa	3745

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 2
 I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 1175
 II.- TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA
 VI.- FUENTE ORIGINAL
 (A) ORGANISMO: Diabrotica virgerifera

SECUENCIA SEQ ID No: 2

Met Tyr Asp Gln Glu Asp Asp Gln Phe Asp Asp Glu Asp Thr Glu Glu
 1 5 10 15

Ile Ser Gly Glu Leu Trp Gln Glu Ala Cys Trp Ile Val Ile Asn Ala
 20 25 30

Tyr Phe Asp Glu Lys Gly Leu Val Arg Gln Gln Leu Asp Ser Phe Asp
 35 40 45

Listado secuencias.txt

Glu Phe Ile Gln Met Ser Val Gln Arg Ile Val Glu Asp Ser Pro Gln
50 55 60

Ile Asp Leu Gln Ala Glu Ala Gln His Thr Ser Gly Glu Ile Glu Thr
65 70 75 80

Pro Pro Arg Tyr Leu Leu Lys Phe Glu Gln Ile Tyr Leu Ser Lys Pro
85 90 95

Thr His Trp Glu Lys Asp Gly Ala Pro Ser Pro Met Met Pro Asn Glu
100 105 110

Ala Arg Leu Arg Asn Leu Thr Tyr Ser Ala Pro Leu Tyr Val Asp Ile
115 120 125

Thr Lys Thr Ile Val Lys Glu Gly Glu Asp Pro Ile Glu Thr Gln His
130 135 140

Gln Lys Thr Phe Ile Gly Lys Ile Pro Ile Met Leu Arg Ser Thr Tyr
145 150 155 160

Cys Leu Leu Ser Gly Leu Thr Asp Arg Asp Leu Thr Glu Leu Asn Glu
165 170 175

Cys Pro Leu Asp Pro Gly Gly Tyr Phe Ile Ile Asn Gly Ser Glu Lys
180 185 190

Val Leu Ile Ala Gln Glu Lys Met Ala Thr Asn Thr Val Tyr Val Phe
195 200 205

Ser Met Lys Asp Gly Lys Tyr Ala Tyr Lys Ser Glu Ile Arg Ser Cys
210 215 220

Leu Glu His Ser Ser Arg Pro Thr Ser Thr Leu Trp Val Asn Met Met
225 230 235 240

Ala Arg Gly Gly Gln Ala Ile Lys Lys Ala Ala Ile Gly Gln Arg Ile
245 250 255

Ile Ala Ile Leu Pro Tyr Ile Lys Gln Glu Ile Pro Ile Met Ile Val
260 265 270

Phe Arg Ala Leu Gly Phe Val Ala Asp Arg Asp Ile Leu Glu His Ile
275 280 285

Listado secuencias.txt

Ile Tyr Asp Phe Asp Asp Pro Glu Leu Met Glu Met Val Lys Pro Ser
290 295 300

Leu Asp Glu Ala Phe Val Ile Gln Glu Gln Asn Ile Ala Leu Asn Phe
305 310 315 320

Ile Gly Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Val Thr Lys Glu Lys Arg Val
325 330 335

Lys Tyr Ala Arg Glu Ile Leu Gln Lys Glu Met Leu Pro His Val Gly
340 345 350

Val Ser Asp Phe Cys Glu Thr Lys Lys Ala Tyr Phe Leu Gly Tyr Met
355 360 365

Val His Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Gly Arg Arg Glu Leu Asp Asp
370 375 380

Arg Asp His Tyr Gly Asn Lys Arg Leu Asp Leu Ala Gly Pro Leu Leu
385 390 395 400

Ala Phe Leu Phe Arg Gly Leu Phe Lys Asn Leu Met Lys Glu Val Arg
405 410 415

Met Tyr Ala Gln Lys Phe Ile Asp Arg Gly Lys Asp Phe Asn Leu Asp
420 425 430

Leu Ala Ile Lys Thr Lys Leu Ile Thr Asp Gly Leu Arg Tyr Ser Leu
435 440 445

Ala Thr Gly Asn Trp Gly Asp Gln Lys Lys Ala His Gln Ala Arg Ala
450 455 460

Gly Val Ser Gln Val Leu Asn Arg Leu Thr Phe Ala Ser Thr Leu Ser
465 470 475 480

His Leu Arg Arg Val Asn Ser Pro Ile Gly Arg Asp Gly Lys Leu Ala
485 490 495

Lys Pro Arg Gln Leu His Asn Thr Leu Trp Gly Met Ile Cys Pro Ala
500 505 510

Glu Thr Pro Glu Gly Ala Ala Val Gly Leu Val Lys Asn Leu Ala Leu
Página 5

Listado secuencias.txt

515 520 525

Met Ala Tyr Ile Ser Val Gly Ser Gln Pro Ser Pro Ile Leu Glu Phe
530 535 540

Leu Glu Glu Trp Ser Met Glu Asn Leu Glu Glu Ile Ala Pro Ser Ala
545 550 555 560

Ile Ala Asn Ala Thr Lys Ile Phe Val Asn Gly Cys Trp Val Gly Ile
565 570 575

His Arg Asp Pro Glu Gln Leu Met Ala Thr Leu Arg Lys Leu Arg Arg
580 585 590

Gln Met Asp Ile Ile Val Ser Glu Val Ser Met Ile Arg Asp Ile Arg
595 600 605

Asp Arg Glu Ile Arg Ile Tyr Thr Asp Ala Gly Arg Ile Cys Arg Pro
610 615 620

Leu Leu Ile Val Glu Asn Gly Gln Leu Leu Leu Lys Lys Arg His Ile
625 630 635 640

Asp Met Leu Lys Glu Arg Glu Tyr Asn Asn Tyr Gly Trp Gln Val Leu
645 650 655

Val Ala Ser Gly Val Val Glu Tyr Ile Asp Thr Leu Glu Glu Glu Thr
660 665 670

Val Met Ile Ala Met Asn Pro Glu Asp Leu Arg Gln Asp Lys Glu Cys
675 680 685

Ala Tyr Cys Thr Thr Tyr Thr His Cys Glu Ile His Pro Ala Met Ile
690 695 700

Leu Gly Val Cys Ala Ser Ile Ile Pro Phe Pro Asp His Asn Gln Ser
705 710 715 720

Pro Arg Asn Thr Tyr Gln Ser Ala Met Gly Lys Gln Ala Met Gly Val
725 730 735

Tyr Ile Thr Asn Phe His Val Arg Met Asp Thr Leu Ala His Val Leu
740 745 750

Listado secuencias.txt

Tyr Tyr Pro His Lys Pro Leu Val Thr Thr Arg Ser Met Glu Tyr Leu
755 760 765

Arg Phe Arg Glu Leu Pro Ala Gly Ile Asn Ser Ile Val Ala Ile Ala
770 775 780

Cys Tyr Thr Gly Tyr Asn Gln Glu Asp Ser Val Ile Leu Asn Ala Ser
785 790 795 800

Ala Val Glu Arg Gly Phe Phe Arg Ser Val Phe Tyr Arg Ser Tyr Lys
805 810 815

Asp Ala Glu Ser Lys Arg Ile Gly Asp Gln Glu Glu Gln Phe Glu Lys
820 825 830

Pro Thr Arg Gln Thr Cys Gln Gly Met Arg Asn Ala Leu Tyr Asp Lys
835 840 845

Leu Asp Asp Asp Gly Leu Ile Ser Pro Gly Ile Arg Val Ser Gly Asp
850 855 860

Asp Val Val Ile Gly Lys Thr Met Thr Leu Pro Glu Thr Asp Asp Glu
865 870 875 880

Leu Asp Gly Thr Thr Lys Arg Tyr Ser Lys Arg Asp Ala Ser Thr Phe
885 890 895

Leu Arg Asn Ser Glu Thr Gly Val Val Asp Gln Val Met Leu Thr Leu
900 905 910

Asn Ser Glu Gly Tyr Lys Phe Cys Lys Ile Arg Val Arg Ser Val Arg
915 920 925

Ile Pro Gln Ile Gly Asp Lys Phe Ala Ser Arg His Gly Gln Lys Gly
930 935 940

Thr Cys Gly Ile Gln Tyr Arg Gln Glu Asp Met Ile Phe Ser Ala Glu
945 950 955 960

Gly Ile Thr Pro Asp Ile Ile Ile Asn Pro His Ala Ile Pro Ser Arg
965 970 975

Met Thr Ile Gly His Leu Ile Glu Cys Ile Gln Gly Lys Val Ser Ser
980 985 990

Listado secuencias.txt

Asn Lys Gly Glu Ile Gly Asp Ala Thr Pro Phe Asn Asp Ala Val Asn
995 1000 1005

Val Gln Lys Ile Ser Thr Leu Leu Gln Glu Tyr Gly Tyr Gln Leu
1010 1015 1020

Arg Gly Asn Glu Val Met Tyr Asn Gly His Thr Gly Arg Lys Ile
1025 1030 1035

Asn Ala Gln Ile Phe Leu Gly Pro Thr Tyr Tyr Gln Arg Leu Lys
1040 1045 1050

His Met Val Asp Asp Lys Ile His Ser Arg Ala Arg Gly Pro Leu
1055 1060 1065

Gln Ile Leu Val Arg Gln Pro Met Glu Gly Arg Ala Arg Asp Gly
1070 1075 1080

Gly Leu Arg Phe Gly Glu Met Glu Arg Asp Cys Gln Ile Ser His
1085 1090 1095

Gly Ala Ala Gln Phe Leu Arg Glu Arg Leu Phe Glu Val Ser Asp
1100 1105 1110

Pro Tyr Arg Ile His Ile Cys Asn Phe Cys Gly Leu Ile Ala Ile
1115 1120 1125

Ala Asn Leu Arg Asn Asn Thr Phe Glu Cys Lys Gly Cys Lys Asn
1130 1135 1140

Lys Thr Gln Ile Ser Gln Val Arg Leu Pro Tyr Ala Ala Lys Leu
1145 1150 1155

Leu Phe Gln Glu Leu Met Ser Met Asn Ile Ala Pro Arg Leu Met
1160 1165 1170

Val Leu
1175

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 3

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 468

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Diabrotica virgerifera

Listado secuencias.txt

SECUENCIA SEQ ID No: 3
 cctacccatt gggagaaaga cgggtgcccc tctcctatga tgcctaataga agctagatta 60
 agaaatttga cttattctgc tcctctttat gtagatataa caaaaacaat tgtgaaagaa 120
 ggagaggatc ctatagaaac tcaacatcag aaaactttta taggtaaaat tcccattatg 180
 ttgaggtcaa catactgtct gctcagtga ttaacagatc gtgatttaac agaattaaac 240
 gagtgtccct tagatcctgg cggatatttc ataattaacg gttctgaaaa agtattaatt 300
 gctcaagaga agatggcaac taacacagta tatgtatttt caatgaaaga cggaaaatat 360
 gcgtacaaat ctgaaataag atcttgtctt gagcacagct ctcggccaac atcaactctg 420
 tgggtaaata tgatggctcg tgggtggccag gccatcaaaa aagctgct 468

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 4
 I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 180
 II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 VI.- FUENTE ORIGINAL
 (A) ORGANISMO: Diabrotica virgerifera

SECUENCIA SEQ ID No: 4
 aaataagaga ctcgatttgg ctggaccatt attggctttc ctcttcagag ggcttttcaa 60
 gaacctaattg aaagaagttc gtatgtatgc ccagaagttt atcgatagag gcaaagattt 120
 caatctggat ctggccatca aaaccaaact aataacggac ggtctgaggt attctctcgc 180

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 5
 I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 161
 II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 VI.- FUENTE ORIGINAL
 (A) ORGANISMO: Diabrotica virgerifera

SECUENCIA SEQ ID No: 5
 ttctgcagta gaaagaggat ttttcagatc tgtgttttac cggctttata aagacgccga 60
 atccaaacgt ataggagacc aggaagaaca attcgaaaaa ccgacaagac agacgtgcca 120
 gggcatgagg aatgcccttt acgataaatt agacgacgac g 161

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 6
 I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 24
 II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 VI.- FUENTE ORIGINAL
 (A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA
 OTRA INFORMACIÓN: promotor de fago T7

Listado secuencias.txt

SECUENCIA SEQ ID No: 6
ttaatacgac tcactatagg gaga

24

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 7
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 503
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA
OTRA INFORMACIÓN: segmento de región codificadora YFP

SECUENCIA SEQ ID No: 7
caccatgggc tccagcggcg ccctgctgtt ccacggcaag atcccctacg tgggtggagat 60
ggaggggcaat gtggatggcc acaccttcag catccgcggc aagggtctacg gcgatgccag 120
cgtggggcaag gtggatggcc agttcatctg caccaccggc gatgtgcccg tgccctggag 180
caccctggtg accaccctga cctacggcgc ccagtgtctt gccaaagtacg gccccgagct 240
gaaggatttc tacaagagct gcatgcccga tggctacgtg caggagcgca ccatcacctt 300
cgagggcgat ggcaatttca agaccgcgc cgaggtgacc ttcgagaatg gcagcgtgta 360
caatcgctg aagctgaatg gccagggctt caagaaggat ggccacgtgc tgggcaagaa 420
tctggagtct aatttcaccc cccactgcct gtacatctgg ggcgatcagg ccaatcacgg 480
cctgaagagc gccttcaaga tct 503

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 8
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 45
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA
OTRA INFORMACIÓN: RNAPreg1-F1T7 Cebador Oligonucleótido PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 8
ttaatacgac tcactatagg gagacctacc cattggggaga aagac

45

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 9
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 43
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA
OTRA INFORMACIÓN: RNAPreg1R1T7 Cebador Oligonucleótido PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 9

```

Listado secuencias.txt
ttaatacgac tcactatagg gagaagcagc ttttttgatg gcc 43

```

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 10
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 47
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: RNAPreg 2 F1T7 Cebador oligonucleótido PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 10

ttaatatcgac tcactatagg gagaaaataa gagactcgat ttggctg 47

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 11

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: RNAPreg2 R1T7 Cebador Oligonucleótido PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 11

ttataacgac tcactatagg gagagcgaga gaataacctca gacc 44

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 12

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 49

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: RNAPreg 3 -F1T7 Cebador Oligonucleótido PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 12

ttataacgac tcactatagg gagattctgc agtagaaaga ggatttttc 49

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 13

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 49

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: RNAPreg 3 R1T7 Cebador Oligonucleótido PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 13

ttaatacgac tcactatagg gagagtcgtc gtctaattta tcgtaaagg 49

Listado secuencias.txt

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 14

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: YFP-F_T7 Oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 14

ttaatagcgc tcactatagg gagacacccat gggctccagc ggcgccc

47

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 15

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: YFP-R_T7 Oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 15

ttaatagcgc tcactatagg gagaagatct tgaaggcgct cttcagg

47

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 16

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 585

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: RNAPII-140 v1 secuencia formadora de ARN de horquilla

SECUENCIA SEQ ID No: 16

aaataagaga ctgcatttgg ctggaccatt attggctttc ctcttcagag ggcttttcaa 60

gaacctaatg aaagaagttc gtatgtatgc ccagaagttt atcgatagag gcaaagattt 120

caatctggat ctggccatca aaaccaaact aataacggac ggtctgaggt attctctcgc 180

gactagtacc ggttgggaaa ggtatgtttc tgcttctacc tttgatatat atataataat 240

tatcactaat tagtagtaat atagtatttc aagtattttt ttcaaaataa aagaatgtag 300

tatatagcta ttgcttttct gtagtttata agtgtgtata ttttaattta taacttttct 360

aatatatgac caaaacatgg tgatgtgcag gttgatccgc ggtagcgag agaatacctc 420

agaccgtccg ttattagttt ggttttgatg gccagatcca gattgaaatc tttgcctcta 480

tcgataaact tctgggcata catacgaact tctttcatta ggttcttgaa aagccctctg 540

aagaggaaag ccaataatgg tccagccaaa tcgagtctct tatttt 585

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 17

Listado secuencias.txt

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 545

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: RNAPII-140 v2 secuencia formadora de ARN de horquilla

SECUENCIA SEQ ID No: 17

ttctgcagta gaaagaggat ttttcagatc tgtgttttac cggctttata aagacgccga	60
atccaaacgt ataggagacc aggaagaaca attcgaaaaa ccgacaagac agacgtgccca	120
gggcatgagg aatgcccttt acgataaatt agacgacgac gactagtacc ggttgggaaa	180
ggtatgtttc tgcttctacc tttgatatat atataataat tatcactaat tagtagtaat	240
atagtatttc aagtattttt ttcaaaataa aagaatgtag tatatagcta ttgcttttct	300
gtagtttata agtgtgtata ttttaattta taacttttct aatatatgac caaaacatgg	360
tgatgtgcag gttgatccgc ggtagtcgt cgtctaattt atcgtaaagg gcattcctca	420
tgccctggca cgtctgtctt gtcggttttt cgaattgttc ttcttggctt cctatacggt	480
tggattcggc gtctttataa gaccggtaaa acacagatct gaaaaatcct ctttctactg	540
cagaa	545

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 18

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 471

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: v2 secuencia formadora de ARN de horquilla YFP

SECUENCIA SEQ ID No: 18

atgtcatctg gagcattct ctttcattggg aagattcctt acgttgtgga gatggaaggg	60
aatgttgatg gccacacctt tagcatacgt gggaaaaggct acggagatgc ctgagtggga	120
aaggactagt accggttggg aaaggtagtg ttctgcttct acctttgata tatatataat	180
aattatcact aattagtagt aatatagtat ttcaagtatt tttttcaaaa taaaagaatg	240
tagtatatag ctattgcttt tctgtagttt ataagtgtgt atattttaat ttataacttt	300
tctaatatat gacaaaaaca tggtagtggt cagggtgac cgcggttact ttccactga	360
ggcatctccg tagcctttcc cacgtatgct aaagggtgtg ccatcaacat tcccttccat	420
ctccacaacg taaggaatct tcccatgaaa gagaagtgtc ccagatgaca t	471

Listado secuencias.txt

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 19

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 225

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Solanum tuberosum

SECUENCIA SEQ ID No: 19

gactagtacc ggttgggaaa ggtatgtttc tgcttctacc tttgatatat atataataat	60
tatcactaat tagtagtaat atagtatttc aagtattttt ttcaaaataa aagaatgtag	120
tatatagcta ttgcttttct gtagtttata agtgtgtata ttttaattta taacttttct	180
aatatatgac caaaacatgg tgatgtgcag gttgatccgc ggtta	225

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 20

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 702

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Planta-optimizada región codificadora de proteína fluorescente amarilla

SECUENCIA SEQ ID No: 20

atgtcatctg gagcacttct ctttcatggg aagattcctt acgttgtgga gatggaaggg	60
aatgttgatg gccacacctt tagcatacgt gggaaaggct acggagatgc ctcatgtgga	120
aaggttgatg cacagttcat ctgcacaact ggtgatgttc ctgtgccttg gagcacactt	180
gtcaccactc tcacctatgg agcacagtgc tttgccaaagt atgggtccaga gttgaaggac	240
ttctacaagt cctgtatgcc agatggctat gtgcaagagc gcacaatcac ctttgaagga	300
gatggcaact tcaagactag ggctgaagtc acctttgaga atgggtctgt ctacaatagg	360
gtcaaactca atgggtcaagg cttcaagaaa gatgggtcatg tgttgggaaa gaacttggag	420
ttcaacttca ctccccactg cctctacatc tggggtgacc aagccaacca cgggtctcaag	480
tcagccttca agatctgtca tgagattact ggcagcaaag gcgacttcat agtggctgac	540
cacaccacaga tgaacactcc cattgggtgga ggtccagttc atgttccaga gtatcatcac	600
atgtcttacc atgtgaaact ttccaaagat gtgacagacc acagagacaa catgtccttg	660
aaagaaactg tcagagctgt tgactgtcgc aagacctacc tt	702

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 21

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 218

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

Listado secuencias.txt

(A) ORGANISMO: Diabrotica virgerifera

SECUENCIA SEQ ID No: 21

tagctctgat gacagagccc atcgagtttc aagccaaaca gttgcataaa gctatcagcg	60
gattgggaac tgatgaaagt acaatmgmtg aaattttaag tgtmcacaac aacgatgaga	120
ttataagaat ttcccaggcc tatgaaggat tgtaccaacg mtcattggaa tctgatatca	180
aaggagatac ctcaggaaca ttaaaaaaga attattag	218

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 22

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 424

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Diabrotica virgerifera

IX.- CARACTERÍSTICA

Nombre: características misceláneas

VIII.- POSICIÓN EN EL GENOMA: (393)..(393)

OTRA INFORMACIÓN: n es a, c, g, o t

IX.- CARACTERÍSTICA

Nombre: características misceláneas

VIII.- POSICIÓN EN EL GENOMA: (394)..(394)

OTRA INFORMACIÓN: n es a, c, g, o t

IX.-CARACTERÍSTICA

Nombre: características misceláneas

VIII.- POSICIÓN EN EL GENOMA: (395)..(395)

OTRA INFORMACIÓN: n es a, c, g, o t

SECUENCIA SEQ ID No: 22

ttgttacaag ctggagaact tctctttgct ggaaccgaag agtcagtatt taatgctgta	60
ttctgtcaaa gaaataaacc acaattgaat ttgatattcg acaaatatga agaaattgtt	120
gggcatccca ttgaaaaagc cattgaaaac gagttttcag gaaatgctaa acaagccatg	180
ttacacctta tccagagcgt aagagatcaa gttgcatatt tggttaaccag gctgcatgat	240
tcaatggcag gcgtcggtag tgacgataga actttaatca gaattgttgt ttcgagatct	300
gaaatcgatc tagaggaaat caaacaatgc tatgaagaaa tctacagtaa aaccttggct	360
gataggatag cggatgacac atctggcgac tannnaaaag ccttattagc cgttgttggt	420
taag	424

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 23

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 397

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Diabrotica virgerifera

Listado secuencias.txt

SECUENCIA SEQ ID No: 23
 agatgttggc tgcatctaga gaattacaca agttcttcca tgattgcaag gatgtactga 60
 gcagaatagt ggaaaaacag gtatccatgt ctgatgaatt gggaagggac gcaggagctg 120
 tcaatgccct tcaacgcaaa caccagaact tcctccaaga cctacaaaca ctccaatcga 180
 acgtccaaca aatccaagaa gaatcagcta aacttcaagc tagctatgcc ggtgatagag 240
 ctaaagaaat caccaacagg gagcaggaag tggtagcagc ctgggcagcc ttgcagatcg 300
 cttgcgatca gagacacgga aaattgagcg atactggtga tctattcaaa ttctttaact 360
 tggtacgaac gttgatgcag tggatggacg aatggac 397

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 24
 I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 490
 II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 VI.- FUENTE ORIGINAL
 (A) ORGANISMO: Diabrotica virgerifera

SECUENCIA SEQ ID No: 24
 gcagatgaac accagcgaga aaccaagaga tgttagtggg gttgaattgt tgatgaacaa 60
 ccatcagaca ctcaaggctg agatcgaagc cagagaagac aactttacgg cttgtatttc 120
 tttaggaaaag gaattgttga gccgtaataca ctatgctagt gctgatatta aggataaatt 180
 ggtcgcgttg acgaatcaaa ggaatgctgt actacagagg tgggaagaaa gatgggagaa 240
 cttgcaactc atcctcgagg tataccaatt cgccagagat gcggccgtcg ccgaagcatg 300
 gttgatcgca caagaacctt acttgatgag ccaagaacta ggacacacca ttgacgacgt 360
 tgaaaacttg ataaagaaac acgaagcggt cgaaaaatcg gcagcggcgc aagaagagag 420
 attcagtgtt ttggagagac tgacgacggt cgaattgaga gaaataaaga ggaaacaaga 480
 agctgcccag 490

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 25
 I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 330
 II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 VI.- FUENTE ORIGINAL
 (A) ORGANISMO: Diabrotica virgerifera

SECUENCIA SEQ ID No: 25
 agtgaaatgt tagcaaatat aacatccaag tttcgtaatt gtacttgctc agttagaaaa 60
 tattctgtag tttcactatc ttcaaccgaa aatagaataa atgtagaacc tcgcgaactt 120
 gcctttcctc caaaatatca agaacctcga caagtttggg tggagagttt agatacgata 180
 gacgacaaaa aattgggtat tcttgagctg catcctgatg tttttgctac taatccaaga 240

Listado secuencias.txt

atagatatta tacatcaaaa tgtttagatgg caaagtttat atagatatgt aagctatgct 300
catacaaagt caagatttga agtgagaggt 330

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 26

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 320

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Diabrotica virgerifera

SECUENCIA SEQ ID No: 26

caaagtcaag atttgaagtg agaggtggag gtcgaaaacc gtggccgcaa aagggattgg 60

gacgtgctcg acatggttca attagaagtc cactttggag aggtggagga gttgttcatt 120

gacaaaaatc tccaaccctt cttttttaca tgattccatt ctacaccctt ttgctggggt 180

tgactagcgc actttcagta aaatttgccc aagatgactt gcacgttggt gatagtctag 240

atctgccaac tgacgaacaa agttatatag aagagctggt caaaagccgc ttttgggggt 300

ccttcttggt ttattttag 320

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 27

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Ann-F1_T7 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 27

ttaatacgac tcactatagg gagagctcca acagtgggtc cttatc 46

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 28

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Ann-R1 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 28

ctaataattc ttttttaagt ttcctgagg 29

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 29

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

Listado secuencias.txt

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Ann-F1 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 29

gctccaacag tggttccta tc

22

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 30

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 53

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Ann-R1_T7 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 30

ttaatacgac tcactatagg gagactaata attctttttt aatgttcctg agg

53

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 31

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 48

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Ann-F2_T7 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 31

ttaatacgac tcactatagg gagattgtta caagctggag aacttctc

48

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 32

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Ann-R2 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 32

cttaaccaac aacggctaata aagg

24

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 33

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

Listado secuencias.txt

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Ann-F2 Oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 33
ttgttacaag ctggagaact tctc

24

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 34

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 48

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Ann-R2T7 Oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 34
ttaatacgac tcactatagg gagacttaac caacaacggc taataagg

48

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 35

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Betasp2-F1_T7 Oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 35
ttaatacgac tcactatagg gagaagatgt tggctgcatc tagagaa

47

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 36

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Betasp2-R1 Oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 36
gtccattcgt ccatccactg ca

22

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 37

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Betasp2-F1 Oligonucleótido de Cebador PCR

Listado secuencias.txt

SECUENCIA SEQ ID No: 37
agatgttggc tgcatttaga gaa 23

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 38
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 46
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA
OTRA INFORMACIÓN: Betasp2-R1_T7 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 38
ttaatacgac tcactatagg gagagtccat tcgtccatcc actgca 46

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 39
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 46
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA
OTRA INFORMACIÓN: Betasp2-F2_T7 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 39
ttaatacgac tcactatagg gagagcagat gaacaccagc gagaaa 46

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 40
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 22
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA
OTRA INFORMACIÓN: Betasp2-R2 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 40
ctgggcagct tcttgtttcc tc 22

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 41
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 22
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA
OTRA INFORMACIÓN: Betasp2-F2 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 41
gcagatgaac accagcgaga aa 22

Listado secuencias.txt

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 42

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Betasp2-R2_T7 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 42

ttaatacgac tcactatagg gagactgggc agcttcttgt ttcctc

46

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 43

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 51

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: L4-F1_T7 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 43

ttaatacgac tcactatagg gagaagtga atgtagcaa atataacatc c

51

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 44

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: L4-R1 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 44

acctctcact tcaaattctg actttg

26

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 45

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: L4-F1 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 45

agtgaaatgt tagcaaatat aacatcc

27

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 46

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

Listado secuencias.txt

(A) LONGITUD: 50

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: L4-R1_T7 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 46

ttaatacgac tcactatagg gagaacctct cacttcaaatt cttgactttg 50

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 47

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 50

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: L4-F2_T7 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 47

ttaatacgac tcactatagg gagacaaagt caagatttga agtgagaggt 50

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 48

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: L4-R2 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 48

ctacaaataa aacaagaagg accccc 25

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 49

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: L4-F2 oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 49

caaagtcaag atttgaagtg agaggt 26

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 50

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 49

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: L4-R2_T7 Oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 50

ttaatacgac tcactatagg gagactacaa ataaaacaag aaggacccc

49

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 51

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1150

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Zea mays

SECUENCIA SEQ ID No: 51

caacggggca gcactgcact gcactgcaac tgcgaatttc cgtcagcttg gagcgggtcca	60
agcgccctgc gaagcaaact acgccgatgg cttcggcggc ggctggggag ggtccgacgg	120
ccgcgggagct gaagacagcg ggggcggagg tgattcccg cggcgtgcga gtgaaggggt	180
gggtcatcca gtcccacaaa ggccctatcc tcaacgccgc ctctctgcaa cgctttgaag	240
atgaacttca aacaacacat ttacctgaga tggtttttgg agagagtttc ttgtcacttc	300
aacatacaca aactggcatc aaatttcatt ttaatgcgct tgatgcactc aaggcatgga	360
agaaagaggc actgccacct gttgaggttc ctgctgcagc aaaatggaag ttcagaagta	420
agccttctga ccagggtata cttgactacg actatacatt tacgacacca tattgtggga	480
gtgatgctgt ggttggtgaac tctggcactc cacaacaag tttagatgga tgcggcactt	540
tgtgttggga ggatactaata gatcggattg acattgttgc cttttcagca aaagaaccca	600
ttcttttcta cgacgagggt atcttgtatg aagatgagtt agctgacaat ggtatctcat	660
ttcttactgt gcgagtgagg gtaatgccaa ctggttggtt tctgcttttg cgtttttggc	720
ttagagttaga tgggtgtactg atgaggttga gagacactcg gttacattgc ctgtttggaa	780
acggcgacgg agccaagcca gtggtacttc gtgagtgtg ctggagggaa gcaacatttg	840
ctactttgtc tgcgaaagga tatccttcgg actctgcagc gtacgcggac ccgaacctta	900
ttgcccataa gcttcctatt gtgacgcaga agacccaaaa gctgaaaaat cctacctgac	960
tgacacaaag gcgccctacc gcgtgtacat catgactgtc ctgtcctatc gttgcctttt	1020
gtgtttgcca catgttgtgg atgtacgtt ctatgacgaa acaccatagt ccatttcgcc	1080
tgggccgaac agagatagct gattgtcatg tcacgtttga attagaccat tccttagccc	1140
tttttcccc	1150

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 52

Listado secuencias.txt

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: T20NV oligonucleótido de Cebador PCR

IX.- CARACTERÍSTICA

Nombre: características misceláneas

VIII.- POSICIÓN EN EL GENOMA: (22)..(22)

OTRA INFORMACIÓN: n e s a, c, g, o t

SECUENCIA SEQ ID No: 52

tttttttttt tttttttttt vn

22

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 53

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: P5U76S (F) oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 53

ttgtgatgtt ggtggcgtat

20

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 54

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: P5U76A (R) oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 54

tgtaaataa aaccccaaag atcg

24

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 55

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: TIPmxF oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 55

tgagggtaat gccaaactggt t

21

Listado secuencias.txt

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 56

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: TIPmXR Oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 56

gcaatgtaac cgagtgtctc tcaa

24

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 57

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: HXTIP Oligonucleótido de sonda

SECUENCIA SEQ ID No: 57

tttttggctt agagttgatg gtgtactgat ga

32

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 58

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 151

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Porción de SpecR región codificadora

SECUENCIA SEQ ID No: 58

gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgaccttt tggaaacttc

60

ggcttcccct ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga

120

cgacatcatt ccgtggcggtt atccagctaa g

151

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 59

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 69

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: Porción de AAD1 región codificadora

SECUENCIA SEQ ID No: 59

	Listado secuencias.txt	
tggttcggttc cctctaccaa gcacagaacc gtcgcttcag caacacctca gtcaagggtga		60
tggatgttg		69

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 60
 I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 4233
 II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 VI.- FUENTE ORIGINAL
 (A) ORGANISMO: Zea mays

SECUENCIA SEQ ID No: 60	
agcctggtgt ttccggagga gacagacatg atccctgccg ttgctgatcc gacgacgctg	60
gacggcgggg ggcgcgcgag gccgttgctc ccggagacgg accctcgggg gcgtgctgcc	120
gccggcgccg agcagaagcg gccgccggct acgccgaccg ttctcaccgc cgtcgtctcc	180
gccgtgctcc tgctcgtcct cgtggcggtc acagtcctcg cgtcgcagca cgtcgacggg	240
caggctgggg gcgttccgc gggcgaagat gccgtcgtcg tcgagggtggc cgcctcccgt	300
ggcgtggctg agggcggtgc ggagaagtcc acggccccgc tcctcggctc cggcgcgctc	360
caggacttct cctggaccaa cgcgatgctg gcgtggcagc gcacggcggt ccacttccag	420
cccccaaga actggatgaa cggttagtgg gaccctgcgc catcggtgac gacgcgcgga	480
tcgttttttt cttttttcct ctcgttctgg ctctaacttg gttccgcggt tctgtcacgg	540
acgcctcgtg cacatggcga taccgatcc gccggccgcg tatatctatc tacctcgacc	600
ggcttctcca gatccgaacg gtaagttggt ggctccgata cgatcgatca catgtgagct	660
cggcatgctg cttttctgcg cgtgcatgcg gctcctagca ttccacgtcc acgggtcgtg	720
acatcaatgc acgatataat cgtatcggtg cagagatatt gtcccatcag ctgctagctt	780
tcgcgtattg atgtcgtgac attttgcacg cagggtccgct gtatcacaag ggctggtacc	840
acctcttcta ccagtggaaac ccggactccg cggtatgggg caacatcacc tggggccacg	900
ccgtctcgcg cgacctctc cactggctgc acctaccgct ggccatggtg cccgatcacc	960
cgtacgacgc caacggcgtc tggtcgggt cggcgacgcg cctgcccgcg ggccggatcg	1020
tcattgctcta cacgggctcc acggcggagt cgtcggcgca ggtgcagaac ctcgaggagc	1080
cggccgacgc gtccgacccg ctgctgcggg agtgggtcaa gtcggacgcc aaccgggtgc	1140
tggtgccgcc gccgggcacg gggccgacgg acttccgcga cccgacgacg gcgtgtcggg	1200
cgccggccgg caacgacacg gcgtggcggg tcgccatcgg gtccaaggac cgggaccacg	1260
cggggctggc gctggtgtac cggacggagg acttcgtgcg gtacgacctg gcgccggcg	1320
tgatgcacgc cgtgccgggc accggcatgt gggagtgcgt ggacttctac ccggtggccg	1380

Listado secuencias.txt

cgggatcagg cgccgcggcg ggcagcgggg acgggctgga gacgtccgcg gcgccgggac	1440
ccggggtgaa gcacgtgctc aaggctagcc tcgacgacga caagcacgac tactacgcga	1500
tcggcaccta cgacccggcg acggacacct ggacccccga cagcgcgagg gacgacgtcg	1560
ggatcggcct ccggtacgac tatggcaagt actacgcgtc gaagaccttc tacgaccccc	1620
tccttcgccg gcgggtgctc tgggggtggg tcggcgagac cgacagcgag cgcgcggaca	1680
tcctcaaggg ctgggcatcc gtgcaggtac gtctcagggt ttgaggctag catggcttca	1740
atcttgctgg catcgaatca ttaatgggca gatattataa cttgataatc tgggttggtt	1800
gtgtgtgggtg gggatggtga cacacgcgcg gtaataatgt agctaagctg gttaaggatg	1860
agtaatgggg ttgctgataa acgacagctc tgctaccatt acttctgaca cccgattgaa	1920
ggagacaaca gtaggggtag ccggtaggggt tcgtcgactt gccttttctt ttttcctttg	1980
ttttgtttgtg gatcgtccaa cacaaggaaa ataggatcat ccaacaaaca tggaagtaat	2040
cccgtaaaac atttctcaag gaaccatcta gctagacgag cgtggcatga tccatgcatg	2100
cacaaacact agataggtct ctgcagctgt gatgttcctt tacatatacc accgtccaaa	2160
ctgaatccgg tctgaaaatt gttcaagcag agaggccccg atcctcacac ctgtacacgt	2220
ccctgtacgc gccgtcgtgg tctcccgtga tcctgccccg tcccctccac gcggccacgc	2280
ctgctgcagc gctctgtaca agcgtgcacc acgtgagaat ttccgtctac tcgagcctag	2340
tagttagacg ggaaaacgag aggaagcgca cggccaagc acaacacttt gcgcggggccc	2400
gtgacttgtc tccggttggc tgagggcgcg cgacagagat gtatggcgcc gcggcgtgtc	2460
ttgtgtcttg tcttgcttat acaccgtagt cagagactgt gtcaaagccg tccaacgaca	2520
atgagctagg aaacgggttg gagagctggg ttcttgccct gcctcctgtg atgtctttgc	2580
cttgcatagg gggcgagta ttagctttg cgttttactt cacgccaag gatactgctg	2640
atcgtgaatt attattatta tatatatatc gaatatcgat ttcgtcgctc tcgtgggggtt	2700
ttattttcca gactcaaact tttcaaaagg cctgtgtttt agttcttttc ttccaattga	2760
gtaggcaagg cgtgtgagtg tgaccaacgc atgcatggat atcgtggtag actggtagag	2820
ctgtcgttac cagcgcgatg cttgtatatg tttgcagtat tttcaaatga atgtctcagc	2880
tagcgtacag ttgaccaagt cgacgtggag ggcgcacaac agacctctga cattattcac	2940
ttttttttta ccatgccgtg cacgtgcagt caatccccag gacggtcctc ctggacacga	3000
agacgggcag caacctgctc cagtggccgg tgggtggagg ggagaacctc cggatgagcg	3060
gcaagagctt cgacggcgct gcgctggacc gcggatccgt cgtgcccctc gacgtcggca	3120
aggcgacgca ggtgacgccg cacgcagcct gctgcagcga acgaactcgc gcgttgccgg	3180

Listado secuencias.txt

cccgcggcca gctgacttag tttctctggc tgatcgaccg tgtgcctgcg tgcgtgcagt	3240
tggacatcga ggctgtgttc gaggtggacg cgtcggacgc ggcgggctc acggaggccg	3300
acgtgacgtt caactgcagc accagcgcag gcgcggcggg ccggggcctg ctcggcccgt	3360
tcggccttct cgtgctggcg gacgacgact tgtccgagca gaccgccgtg tacttctacc	3420
tgctcaaggg cacggacggc agcctccaaa ctttcttctg ccaagacgag ctcaggtatg	3480
tatgttatga cttatgacca tgcattgcag cgcatttctt agctaggctg tgaagcttct	3540
tgttgagttg tttcacagat gcttaccgtc tgctttgttt cgtatttcga ctaggcattc	3600
aaggcgaacg atctggttaa gagagtatac gggagcttgg tcctgtgct agatggggag	3660
aatctctcgg tcagaatact ggtaagtttt tacagcgcca gccatgcatg tgttggccag	3720
ccagctgctg gtactttgga cactcgttct tctcgactg ctcattattg cttctgatct	3780
ggatgcacta caaattgaag gttgaccact ccacgtgga gagctttgct caaggcggga	3840
ggacgtgcat cacgtcgcga gtgtacccca cagagccat ctacgactcc gccgcgtct	3900
tcctcttcaa caacgccaca catgctcacg tcaaagcaaa atccgtcaag atctggcagc	3960
tcaactccgc ctacatccgg ccatatccgg caacgacgac ttctctatga ctaaattaag	4020
tgacggacag ataggcgata ttgcatactt gcatcatgaa ctcatttgta caacagtgat	4080
tgtttaattt atttgctgcc ttcttatcc ttcttgtaaa actatatggt acacacatgt	4140
atcattaggt ctagtagtgt tgttgcaaag acacttagac accagagggt ccaggagtat	4200
cagagataag gtataagagg gagcaggag cag	4233

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 61

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: ST-LS1- F oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 61

gtatgtttct gcttctacct ttgat

25

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 62

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

Listado secuencias.txt

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: ST-LS1- R Oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 62
ccatgttttg gtcatatatt agaaaagtt

29

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 63

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 34

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: ST-LS1-P Oligonucleótido de sonda

SECUENCIA SEQ ID No: 63
agtaatatag tatttcaagt atttttttca aaat

34

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 64

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: GAAD1-F Oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 64
tggtcggttc cctctaccaa

20

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 65

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: GAAD1-R Oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 65
caacatccat caccttgact ga

22

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 66

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: GAAD1-P Oligonucleótido sonda

Listado secuencias.txt

SECUENCIA SEQ ID No: 66
cacagaaccg tcgcttcagc aaca 24

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 67
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 18
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA
OTRA INFORMACIÓN: IVR1-F oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 67
tggcggacga cgacttgt 18

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 68
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 19
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA
OTRA INFORMACIÓN: IVR1-R oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 68
aaagtttgga ggctgccgt 19

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 69
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 26
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA
OTRA INFORMACIÓN: IVR1-P oligonucleótido de sonda

SECUENCIA SEQ ID No: 69
cgagcagacc gccgtgtact tctacc 26

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 70
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 19
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA
OTRA INFORMACIÓN: SPC1A oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 70
cttagctgga taacgccac 19

Listado secuencias.txt

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 71

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: SPC1S oligonucleótido de Cebador PCR

SECUENCIA SEQ ID No: 71

gaccgtaagg ctgatgaa

19

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 72

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: TQSPEC Pligonucleótido de Sonda

SECUENCIA SEQ ID No: 72

cgagattctc cgcgctgtag a

21

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 73

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 3093

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Meligethes aeneus

SECUENCIA SEQ ID No: 73

gagacccaac accagaagac ttcataggg aaaatcccgaa ttatgttgag gtctacgtac

60

tgccttctca gcggcttaac agatcgtgat ttgacggagt taaacgagtg tcctttggat

120

cccggggggtt atttcatcat aaacgggtcg gagaagggtt taattgccca ggaaaaaatg

180

gctacgaaca cagtgtatgt gttttcgatg aaggacggga aatacgcgtt taaatccgag

240

attaggtcgt gtttgagca ttcttcgcgc cccacctcca ctttgtgggt gaatatgatg

300

gctcgtggcg ggcaagctgt gaaaaaggca gccatcgggc aaagaatcat cgctatttta

360

ccatatatca agcaagaaat acccattatg atcgtattca gagcgctagg ttttgtggcc

420

gacagagaca tcctcgaaca catcatctat gactttgacg accctgaaat gatggagatg

480

gtgaaaccgt ccctagacga ggcttttgta atccaagagc aggggtgtggc cttgaatttt

540

attggtgcta gaggggccag gcccggcgta acgagggaaa agcgtgttaa atacgccagg

600

gaaattttgc agaaggaaat gctgccgcat gtaggagttt ccgattttctg cgaaacaaaa

660

Listado secuencias.txt						
aaagcgtatt	tcttggggta	catggtgcac	aggctgcttc	tggcctcttt	ggggcgcaga	720
gagtttagacg	acagggatca	ttacggcaac	aaaaggttgg	atttggctgg	gccgttgctg	780
gctttcttgt	tcagaggtct	tttcaaaaac	ttaatgaagg	aagtgcgcat	gtacgccccaa	840
aaattcatcg	acagaggaaa	agatttcaac	ttggatttgg	caatcaaaac	caaactcatc	900
accgacggtt	tgcgttactc	tcttgccacc	ggtaactggg	gcgaccagaa	aaaggcccat	960
caagccagag	ccggagtgtc	tcaggtactg	aacagactga	cttacgcctc	gactttatct	1020
catttgaggc	gcgtaaactc	gcccacggt	cgcgacggta	aactagccaa	accccgtcag	1080
ttgcacaaca	ccctgtgggg	catgatttgc	ccggcggaaa	cgccagaggg	cgctgcggtg	1140
ggtttggtaa	aaaatctcgc	ccttatggct	tacatttccg	tcggttcgca	accctctccg	1200
atcttggagt	tcttggagga	gtggtcgatg	gagaatttgg	aggaaatagc	gccgtctgct	1260
atcgctaacg	ccactaagat	ttttgtcaat	gggtgttggg	tcggtattca	cagggatccg	1320
gagcaattga	cggcgacttt	gaggaagcta	cgtcgccaga	tggatattat	cgtatccgag	1380
gtatccatga	tccgtgatat	ccgcgatcgc	gaaatccgta	tctacacgga	tgctggtcgt	1440
atctgcagac	ctttattgat	tgctaaaaat	ggcagcctgt	tactgaaaaa	agaacacatc	1500
gacatgttga	aagagagaga	atacaacaac	tatggctggc	aagtgttggg	agcctcaggt	1560
gttgtcgaat	acattgacac	cctagaagaa	gaaactgtga	tgattgccat	gtctcctgac	1620
gatttgagac	aagacaagga	gtgcgcctac	tgtacgactt	acactcactg	cgaaattcat	1680
cccgccatga	ttttgggagt	ctgcgcgtca	attatcccgt	tccccgatca	caaccaaagt	1740
cccaggaaca	cctatcaaag	cgccatggga	aaacaagcca	tgggcgtgta	cataacaaac	1800
ttccacgtgc	ggatggacac	gctcgcgcac	gtgctctact	acccccacaa	accgctggta	1860
accaccagat	ccatggagta	cctgcggttc	agagagcttc	ccgccggcat	caacagcatc	1920
gtggccatcg	cctgctacac	cggctacaac	caggaggatt	cggttatttt	aaacgcttcg	1980
gccgtcgaaa	gaggcttctt	ccgatcgggtg	ttttatcggt	cgtacaagga	cgccgagtcc	2040
aagcgcattg	gggatcagga	ggagcagttc	gagaagccga	ccaggcagac	ctgccagggc	2100
atgcgcaacg	cgctgtacga	caaactcgac	gacgacggta	tcatttcgcc	cggatttcgt	2160
gtctccgggg	acgacgtcgt	catcggcaaa	accatgacac	tcccggaaaa	cgacgatgag	2220
ctggacggta	acacgaagaa	gttcaccaag	agggacgcca	gtactttctt	gcgtaacagc	2280
gagactggcg	tggatgatca	ggtgatgttg	accttgaact	ccgagggtta	caagttctgt	2340
aagattcgcg	tgagggtccgt	gaggattccg	cagataggcg	acaaattcgc	ctcgcgtcac	2400
gggcagaagg	gtacttgcg	catacagtac	cggcaagaag	atatgatttt	ctcgtgcgag	2460

Listado secuencias.txt

ggtttgaccc cggacatcat catcaacccg cagccatcc catctcgat gacgattggg	2520
catttgatcg agtgcacca aggtaaggta tcggcgaata agggggagat cggggacgcg	2580
accccggttta acgacgcggt aaacgtgcag aaaatttcca ctctcctgca agagtacggg	2640
taccaactga gagggaaacga ggtgatgtac aacggggcaca cggggcgcaa aatgaacgcg	2700
cagattttcc tgggccccac ctactaccag cgcctcaagc acatggtgga cgataagatc	2760
cactcgaggg ccagagggcc ggtgcagatc ctctgcaggc agcccatgga gggtcgagcc	2820
agggacgggg gcctgcgttt cggggagatg gagcgcgatt gccagatttc gcacggcgcg	2880
gcgcagtttc tgcgcgagcg cttgttcgag gtgtccgac cctacaggat ccacgtgtgc	2940
aacttctgcg ggctgatcgc catcgtaac ttgcggaaca acacgttcga gtgcaagggg	3000
tgcaagaata agacgcagat ttcgcagaca tggatcctgt agggatcgga cacctcgaac	3060
aagcgctcgc gcagaaactg cgccgcgccg tgc	3093

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 74

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1013

II.- TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: *Melipethes aeneus*

SECUENCIA SEQ ID No: 74

Glu Thr Gln His Gln Lys Thr Phe Ile Gly Lys Ile Pro Ile Met Leu
1 5 10 15

Arg Ser Thr Tyr Cys Leu Leu Ser Gly Leu Thr Asp Arg Asp Leu Thr
20 25 30

Glu Leu Asn Glu Cys Pro Leu Asp Pro Gly Gly Tyr Phe Ile Ile Asn
35 40 45

Gly Ser Glu Lys Val Leu Ile Ala Gln Glu Lys Met Ala Thr Asn Thr
50 55 60

Val Tyr Val Phe Ser Met Lys Asp Gly Lys Tyr Ala Phe Lys Ser Glu
65 70 75 80

Ile Arg Ser Cys Leu Glu His Ser Ser Arg Pro Thr Ser Thr Leu Trp
85 90 95

Val Asn Met Met Ala Arg Gly Gly Gln Ala Val Lys Lys Ala Ala Ile
100 105 110

Listado secuencias.txt

Gly Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Pro Tyr Ile Lys Gln Glu Ile Pro
115 120 125

Ile Met Ile Val Phe Arg Ala Leu Gly Phe Val Ala Asp Arg Asp Ile
130 135 140

Leu Glu His Ile Ile Tyr Asp Phe Asp Asp Pro Glu Met Met Glu Met
145 150 155 160

Val Lys Pro Ser Leu Asp Glu Ala Phe Val Ile Gln Glu Gln Gly Val
165 170 175

Ala Leu Asn Phe Ile Gly Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Val Thr Arg
180 185 190

Glu Lys Arg Val Lys Tyr Ala Arg Glu Ile Leu Gln Lys Glu Met Leu
195 200 205

Pro His Val Gly Val Ser Asp Phe Cys Glu Thr Lys Lys Ala Tyr Phe
210 215 220

Leu Gly Tyr Met Val His Arg Leu Leu Leu Ala Ser Leu Gly Arg Arg
225 230 235 240

Glu Leu Asp Asp Arg Asp His Tyr Gly Asn Lys Arg Leu Asp Leu Ala
245 250 255

Gly Pro Leu Leu Ala Phe Leu Phe Arg Gly Leu Phe Lys Asn Leu Met
260 265 270

Lys Glu Val Arg Met Tyr Ala Gln Lys Phe Ile Asp Arg Gly Lys Asp
275 280 285

Phe Asn Leu Asp Leu Ala Ile Lys Thr Lys Leu Ile Thr Asp Gly Leu
290 295 300

Arg Tyr Ser Leu Ala Thr Gly Asn Trp Gly Asp Gln Lys Lys Ala His
305 310 315 320

Gln Ala Arg Ala Gly Val Ser Gln Val Leu Asn Arg Leu Thr Tyr Ala
325 330 335

Ser Thr Leu Ser His Leu Arg Arg Val Asn Ser Pro Ile Gly Arg Asp

Gly Lys Leu Ala Lys Pro Arg Gln Leu His Asn Thr Leu Trp Gly Met
355 360 365

Ile Cys Pro Ala Glu Thr Pro Glu Gly Ala Ala Val Gly Leu Val Lys
370 375 380

Asn Leu Ala Leu Met Ala Tyr Ile Ser Val Gly Ser Gln Pro Ser Pro
385 390 395 400

Ile Leu Glu Phe Leu Glu Glu Trp Ser Met Glu Asn Leu Glu Glu Ile
405 410 415

Ala Pro Ser Ala Ile Ala Asn Ala Thr Lys Ile Phe Val Asn Gly Cys
420 425 430

Trp Val Gly Ile His Arg Asp Pro Glu Gln Leu Thr Ala Thr Leu Arg
435 440 445

Lys Leu Arg Arg Gln Met Asp Ile Ile Val Ser Glu Val Ser Met Ile
450 455 460

Arg Asp Ile Arg Asp Arg Glu Ile Arg Ile Tyr Thr Asp Ala Gly Arg
465 470 475 480

Ile Cys Arg Pro Leu Leu Ile Ala Lys Asn Gly Ser Leu Leu Leu Lys
485 490 495

Lys Glu His Ile Asp Met Leu Lys Glu Arg Glu Tyr Asn Asn Tyr Gly
500 505 510

Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Gly Val Val Glu Tyr Ile Asp Thr Leu
515 520 525

Glu Glu Glu Thr Val Met Ile Ala Met Ser Pro Asp Asp Leu Arg Gln
530 535 540

Asp Lys Glu Cys Ala Tyr Cys Thr Thr Tyr Thr His Cys Glu Ile His
545 550 555 560

Pro Ala Met Ile Leu Gly Val Cys Ala Ser Ile Ile Pro Phe Pro Asp
565 570 575

Listado secuencias.txt

His Asn Gln Ser Pro Arg Asn Thr Tyr Gln Ser Ala Met Gly Lys Gln
580 585 590

Ala Met Gly Val Tyr Ile Thr Asn Phe His Val Arg Met Asp Thr Leu
595 600 605

Ala His Val Leu Tyr Tyr Pro His Lys Pro Leu Val Thr Thr Arg Ser
610 615 620

Met Glu Tyr Leu Arg Phe Arg Glu Leu Pro Ala Gly Ile Asn Ser Ile
625 630 635 640

Val Ala Ile Ala Cys Tyr Thr Gly Tyr Asn Gln Glu Asp Ser Val Ile
645 650 655

Leu Asn Ala Ser Ala Val Glu Arg Gly Phe Phe Arg Ser Val Phe Tyr
660 665 670

Arg Ser Tyr Lys Asp Ala Glu Ser Lys Arg Ile Gly Asp Gln Glu Glu
675 680 685

Gln Phe Glu Lys Pro Thr Arg Gln Thr Cys Gln Gly Met Arg Asn Ala
690 695 700

Leu Tyr Asp Lys Leu Asp Asp Asp Gly Ile Ile Ser Pro Gly Ile Arg
705 710 715 720

Val Ser Gly Asp Asp Val Val Ile Gly Lys Thr Met Thr Leu Pro Glu
725 730 735

Asn Asp Asp Glu Leu Asp Gly Asn Thr Lys Lys Phe Thr Lys Arg Asp
740 745 750

Ala Ser Thr Phe Leu Arg Asn Ser Glu Thr Gly Val Val Asp Gln Val
755 760 765

Met Leu Thr Leu Asn Ser Glu Gly Tyr Lys Phe Cys Lys Ile Arg Val
770 775 780

Arg Ser Val Arg Ile Pro Gln Ile Gly Asp Lys Phe Ala Ser Arg His
785 790 795 800

Gly Gln Lys Gly Thr Cys Gly Ile Gln Tyr Arg Gln Glu Asp Met Ile
805 810 815

Listado secuencias.txt

Phe Ser Cys Glu Gly Leu Thr Pro Asp Ile Ile Ile Asn Pro His Ala
820 825 830

Ile Pro Ser Arg Met Thr Ile Gly His Leu Ile Glu Cys Ile Gln Gly
835 840 845

Lys Val Ser Ala Asn Lys Gly Glu Ile Gly Asp Ala Thr Pro Phe Asn
850 855 860

Asp Ala Val Asn Val Gln Lys Ile Ser Thr Leu Leu Gln Glu Tyr Gly
865 870 875 880

Tyr Gln Leu Arg Gly Asn Glu Val Met Tyr Asn Gly His Thr Gly Arg
885 890 895

Lys Met Asn Ala Gln Ile Phe Leu Gly Pro Thr Tyr Tyr Gln Arg Leu
900 905 910

Lys His Met Val Asp Asp Lys Ile His Ser Arg Ala Arg Gly Pro Val
915 920 925

Gln Ile Leu Val Arg Gln Pro Met Glu Gly Arg Ala Arg Asp Gly Gly
930 935 940

Leu Arg Phe Gly Glu Met Glu Arg Asp Cys Gln Ile Ser His Gly Ala
945 950 955 960

Ala Gln Phe Leu Arg Glu Arg Leu Phe Glu Val Ser Asp Pro Tyr Arg
965 970 975

Ile His Val Cys Asn Phe Cys Gly Leu Ile Ala Ile Ala Asn Leu Arg
980 985 990

Asn Asn Thr Phe Glu Cys Lys Gly Cys Lys Asn Lys Thr Gln Ile Ser
995 1000 1005

Gln Thr Trp Ile Leu
1010

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 75
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 2279
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: *Meligethes aeneus*

Listado secuencias.txt

SECUENCIA SEQ ID No: 75

gagacccaac accagaagac tttcataggg aaaatcccga ttatgttgag gtctacgtac	60
tgcccttctca gcggcttaac agatcgtgat ttgacggagt taaacgagtg tcctttggat	120
cccggggggtt atttcatcat aaacgggtcg gagaagggtt taattgcca ggaaaaaatg	180
gctacgaaca cagtgtatgt gttttcgatg aaggacggga aatacgcgtt taaatccgag	240
attaggtcgt gtttggagca ttcttcgcgc ccacacctca ctttgtgggt gaacatgatg	300
gcccgtggtg ggcaggctgt caaaaaggcg gccatcgggc aaagaattat tgccatttta	360
ccatatatca agcaagaaat acccattatg atcgtattca gagcgttggg ttttgtggct	420
gacagagata tcctggaaca catcatttat gactttgacg accctgaaat gatggagatg	480
gtgaaaccgt ccctggacga ggcctttgta attcaagagc aggggtgtggc tttgaatttt	540
atcggggcta gaggggccag gcccggcgta acgagggaaa agcgtgttaa atacgccagg	600
gaaattttgc agaaggaaat gctgccgat gtaggagttt ccgatttctg cgaaaccaa	660
aaagcgtatt tcttggggta catggtgcac aggctgcttc tggcctcttt ggggcgcaga	720
gagttagacg acagggatca ttacggcaac aaaagggttg atttggctgg gccgttgctg	780
gctttcttgt tcagaggtct tttcaaaaac ttaatgaagg aagtgcgat gtacgccccaa	840
aaattcatcg acagaggaaa agatttcaac ttggatttgg caatcaaac caaactcatc	900
accgacgggt tgcgttactc tcttgccacc ggtaactggg gcgaccagaa aaaggcccat	960
caagccagag ccggagtgtc tcaggtagtg aacagactga cttacgcctc gactttatct	1020
catttgaggc gcgtaaactc gcccatcggg cgcgacggta aactagccaa accccgtcag	1080
ttgcacaaca ccctgtgggg catgatttgc ccggcggaaa cgccagaggg cgctgcggtg	1140
ggtttggttaa aaaatctcgc ctttatggct tacatttccg tcggttcgca accctctccg	1200
atcttggagt tcttggagga gtggtcgatg gagaatttgg aggaaatagc gccgtctgct	1260
atcgctaacg ccactaagat ttttgtcaat ggggtgttggg tcggtattca cagggatccg	1320
gagcaattga cggcgacttt gaggaagcta cgtcgccaga tggatattat cgtatccgag	1380
gtatccatga tccgtgatat ccgcgatcgc gaaatccgta tctacacgga tgctggtcgt	1440
atttgcagac ctttattgat tgctaaaaat ggcagcctgt tactgaaaaa agaacacatc	1500
gacatgttga aagagagaga atacaacaac tatggctggc aagtgttggg agcctcaggt	1560
gttgtcgaat acattgacac cctagaagaa gaaactgtga tgattgccat gtctcctgac	1620
gatttgagac aagacaagga gtgcgcctac tgtacgactt acactcactg cgaaattcat	1680
cccgccatga ttttgggagt ctgcgcgtca attatcccgt tccccgatca caaccaaagt	1740

Listado secuencias.txt

cccaggaaca cctatcaaag cgccatggga aaacaagcca tgggcgtgta cataacaaac	1800
ttccacgtgc ggatggacac gctcgcgcac gtgctctact acccccacaa accgctggta	1860
accaccagat ccatggagta cctgcggttc agagagctcc ccgccggcat caacagcatc	1920
gtggccatcg cctgctacac cggctacaac caggaagatt cggttatatt gaacgcttcg	1980
gccgtcgaaa gaggcttctt ccggtcgggtg ttctaccgtt cgtacaagga cgccgagtcc	2040
aaacggatcg gggatcagga ggagcagttc gagaagccga ccaggcagac ctgccagggc	2100
atgcgcaacg cgctgtacga caaattggac gacgacggca taatttcgcc tggcatccgt	2160
gtttccgggg acgatgtcgt cataggcaaa accatgacac tcccggagaa cgatgatgag	2220
ctggacggta acacgaagaa gttaccaag agggacgcca gtactttctt gcgtaacag	2279

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 76

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 759

II.- TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: *Meligethes aeneus*

SECUENCIA SEQ ID No: 76

Glu Thr Gln His Gln Lys Thr Phe Ile Gly Lys Ile Pro Ile Met Leu
1 5 10 15

Arg Ser Thr Tyr Cys Leu Leu Ser Gly Leu Thr Asp Arg Asp Leu Thr
20 25 30

Glu Leu Asn Glu Cys Pro Leu Asp Pro Gly Gly Tyr Phe Ile Ile Asn
35 40 45

Gly Ser Glu Lys Val Leu Ile Ala Gln Glu Lys Met Ala Thr Asn Thr
50 55 60

Val Tyr Val Phe Ser Met Lys Asp Gly Lys Tyr Ala Phe Lys Ser Glu
65 70 75 80

Ile Arg Ser Cys Leu Glu His Ser Ser Arg Pro Thr Ser Thr Leu Trp
85 90 95

Val Asn Met Met Ala Arg Gly Gly Gln Ala Val Lys Lys Ala Ala Ile
100 105 110

Gly Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Pro Tyr Ile Lys Gln Glu Ile Pro
115 120 125

Listado secuencias.txt

Ile Met Ile Val Phe Arg Ala Leu Gly Phe Val Ala Asp Arg Asp Ile
130 135 140

Leu Glu His Ile Ile Tyr Asp Phe Asp Asp Pro Glu Met Met Glu Met
145 150 155 160

Val Lys Pro Ser Leu Asp Glu Ala Phe Val Ile Gln Glu Gln Gly Val
165 170 175

Ala Leu Asn Phe Ile Gly Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Val Thr Arg
180 185 190

Glu Lys Arg Val Lys Tyr Ala Arg Glu Ile Leu Gln Lys Glu Met Leu
195 200 205

Pro His Val Gly Val Ser Asp Phe Cys Glu Thr Lys Lys Ala Tyr Phe
210 215 220

Leu Gly Tyr Met Val His Arg Leu Leu Leu Ala Ser Leu Gly Arg Arg
225 230 235 240

Glu Leu Asp Asp Arg Asp His Tyr Gly Asn Lys Arg Leu Asp Leu Ala
245 250 255

Gly Pro Leu Leu Ala Phe Leu Phe Arg Gly Leu Phe Lys Asn Leu Met
260 265 270

Lys Glu Val Arg Met Tyr Ala Gln Lys Phe Ile Asp Arg Gly Lys Asp
275 280 285

Phe Asn Leu Asp Leu Ala Ile Lys Thr Lys Leu Ile Thr Asp Gly Leu
290 295 300

Arg Tyr Ser Leu Ala Thr Gly Asn Trp Gly Asp Gln Lys Lys Ala His
305 310 315 320

Gln Ala Arg Ala Gly Val Ser Gln Val Leu Asn Arg Leu Thr Tyr Ala
325 330 335

Ser Thr Leu Ser His Leu Arg Arg Val Asn Ser Pro Ile Gly Arg Asp
340 345 350

Gly Lys Leu Ala Lys Pro Arg Gln Leu His Asn Thr Leu Trp Gly Met

Listado secuencias.txt

355
 Ile Cys Pro Ala Glu Thr Pro Glu Gly Ala Ala Val Gly Leu Val Lys
 370 375 380
 Asn Leu Ala Leu Met Ala Tyr Ile Ser Val Gly Ser Gln Pro Ser Pro
 385 390 395 400
 Ile Leu Glu Phe Leu Glu Glu Trp Ser Met Glu Asn Leu Glu Glu Ile
 405 410 415
 Ala Pro Ser Ala Ile Ala Asn Ala Thr Lys Ile Phe Val Asn Gly Cys
 420 425 430
 Trp Val Gly Ile His Arg Asp Pro Glu Gln Leu Thr Ala Thr Leu Arg
 435 440 445
 Lys Leu Arg Arg Gln Met Asp Ile Ile Val Ser Glu Val Ser Met Ile
 450 455 460
 Arg Asp Ile Arg Asp Arg Glu Ile Arg Ile Tyr Thr Asp Ala Gly Arg
 465 470 475 480
 Ile Cys Arg Pro Leu Leu Ile Ala Lys Asn Gly Ser Leu Leu Leu Lys
 485 490 495
 Lys Glu His Ile Asp Met Leu Lys Glu Arg Glu Tyr Asn Asn Tyr Gly
 500 505 510
 Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Gly Val Val Glu Tyr Ile Asp Thr Leu
 515 520 525
 Glu Glu Glu Thr Val Met Ile Ala Met Ser Pro Asp Asp Leu Arg Gln
 530 535 540
 Asp Lys Glu Cys Ala Tyr Cys Thr Thr Tyr Thr His Cys Glu Ile His
 545 550 555 560
 Pro Ala Met Ile Leu Gly Val Cys Ala Ser Ile Ile Pro Phe Pro Asp
 565 570 575
 His Asn Gln Ser Pro Arg Asn Thr Tyr Gln Ser Ala Met Gly Lys Gln
 580 585 590

Listado secuencias.txt

Ala Met Gly Val Tyr Ile Thr Asn Phe His Val Arg Met Asp Thr Leu
595 600 605

Ala His Val Leu Tyr Tyr Pro His Lys Pro Leu Val Thr Thr Arg Ser
610 615 620

Met Glu Tyr Leu Arg Phe Arg Glu Leu Pro Ala Gly Ile Asn Ser Ile
625 630 635 640

Val Ala Ile Ala Cys Tyr Thr Gly Tyr Asn Gln Glu Asp Ser Val Ile
645 650 655

Leu Asn Ala Ser Ala Val Glu Arg Gly Phe Phe Arg Ser Val Phe Tyr
660 665 670

Arg Ser Tyr Lys Asp Ala Glu Ser Lys Arg Ile Gly Asp Gln Glu Glu
675 680 685

Gln Phe Glu Lys Pro Thr Arg Gln Thr Cys Gln Gly Met Arg Asn Ala
690 695 700

Leu Tyr Asp Lys Leu Asp Asp Asp Gly Ile Ile Ser Pro Gly Ile Arg
705 710 715 720

Val Ser Gly Asp Asp Val Val Ile Gly Lys Thr Met Thr Leu Pro Glu
725 730 735

Asn Asp Asp Glu Leu Asp Gly Asn Thr Lys Lys Phe Thr Lys Arg Asp
740 745 750

Ala Ser Thr Phe Leu Arg Asn
755

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 77

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 447

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: *Meligethes aeneus*

SECUENCIA SEQ ID No: 77

ccgacggttt gcgttactct cttgccaccg gtaactgggg cgaccagaaa aaggcccatc 60

aagccagagc cggagtgtct caggtattga acagactgac ttacgcctcg actttatctc 120

atttgaggcg cgtaaactcg cccatcggtc gcgacggtaa attagccaaa ccccgtcagt 180

tgcacaacac cctgtggggc atgatttgcc cggcggaaac gccagagggc gctgcggtgg 240

Listado secuencias.txt

gtttggtaaa aaatctcgcc cttatggctt acatttccgt cggttcgcaa ccctctccga	300
tcttggagtt cttggaggag tggtcgatgg agaatttggg ggaaatagcg ccgtctgcta	360
tcgctaacgc cactaagatt tttgtcaatg ggtgttgggt cggatttcac agggatccgg	420
agcaattgac ggcgactttg aggaaac	447

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 78

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: cebador delantero para amplificar RpII140

SECUENCIA SEQ ID No: 78

taatacgact cactataggg agagtttcct caaagtcgcc gtca	44
--	----

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 79

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44

II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Secuencia artificial

IX.- CARACTERÍSTICA

OTRA INFORMACIÓN: cebador inverso para amplificar RpII140

SECUENCIA SEQ ID No: 79

taatacgact cactataggg agaccgacgg ttgcggttac tctc	44
--	----

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 80

I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 999

II.- TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

VI.- FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: *Meliponethes aeneus*

SECUENCIA SEQ ID No: 80

Met	Leu	Arg	Ser	Thr	Tyr	Cys	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Thr	Asp	Arg	Asp
1				5					10					15	

Leu	Thr	Glu	Leu	Asn	Glu	Cys	Pro	Leu	Asp	Pro	Gly	Gly	Tyr	Phe	Ile
		20						25					30		

Ile	Asn	Gly	Ser	Glu	Lys	Val	Leu	Ile	Ala	Gln	Glu	Lys	Met	Ala	Thr
	35						40					45			

Listado secuencias.txt

Asn Thr Val Tyr Val Phe Ser Met Lys Asp Gly Lys Tyr Ala Phe Lys
50 55 60

Ser Glu Ile Arg Ser Cys Leu Glu His Ser Ser Arg Pro Thr Ser Thr
65 70 75 80

Leu Trp Val Asn Met Met Ala Arg Gly Gly Gln Ala Val Lys Lys Ala
85 90 95

Ala Ile Gly Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Pro Tyr Ile Lys Gln Glu
100 105 110

Ile Pro Ile Met Ile Val Phe Arg Ala Leu Gly Phe Val Ala Asp Arg
115 120 125

Asp Ile Leu Glu His Ile Ile Tyr Asp Phe Asp Asp Pro Glu Met Met
130 135 140

Glu Met Val Lys Pro Ser Leu Asp Glu Ala Phe Val Ile Gln Glu Gln
145 150 155 160

Gly Val Ala Leu Asn Phe Ile Gly Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Val
165 170 175

Thr Arg Glu Lys Arg Val Lys Tyr Ala Arg Glu Ile Leu Gln Lys Glu
180 185 190

Met Leu Pro His Val Gly Val Ser Asp Phe Cys Glu Thr Lys Lys Ala
195 200 205

Tyr Phe Leu Gly Tyr Met Val His Arg Leu Leu Leu Ala Ser Leu Gly
210 215 220

Arg Arg Glu Leu Asp Asp Arg Asp His Tyr Gly Asn Lys Arg Leu Asp
225 230 235 240

Leu Ala Gly Pro Leu Leu Ala Phe Leu Phe Arg Gly Leu Phe Lys Asn
245 250 255

Leu Met Lys Glu Val Arg Met Tyr Ala Gln Lys Phe Ile Asp Arg Gly
260 265 270

Lys Asp Phe Asn Leu Asp Leu Ala Ile Lys Thr Lys Leu Ile Thr Asp
275 280 285

Listado secuencias.txt

Gly Leu Arg Tyr Ser Leu Ala Thr Gly Asn Trp Gly Asp Gln Lys Lys
290 295 300

Ala His Gln Ala Arg Ala Gly Val Ser Gln Val Leu Asn Arg Leu Thr
305 310 315 320

Tyr Ala Ser Thr Leu Ser His Leu Arg Arg Val Asn Ser Pro Ile Gly
325 330 335

Arg Asp Gly Lys Leu Ala Lys Pro Arg Gln Leu His Asn Thr Leu Trp
340 345 350

Gly Met Ile Cys Pro Ala Glu Thr Pro Glu Gly Ala Ala Val Gly Leu
355 360 365

Val Lys Asn Leu Ala Leu Met Ala Tyr Ile Ser Val Gly Ser Gln Pro
370 375 380

Ser Pro Ile Leu Glu Phe Leu Glu Glu Trp Ser Met Glu Asn Leu Glu
385 390 395 400

Glu Ile Ala Pro Ser Ala Ile Ala Asn Ala Thr Lys Ile Phe Val Asn
405 410 415

Gly Cys Trp Val Gly Ile His Arg Asp Pro Glu Gln Leu Thr Ala Thr
420 425 430

Leu Arg Lys Leu Arg Arg Gln Met Asp Ile Ile Val Ser Glu Val Ser
435 440 445

Met Ile Arg Asp Ile Arg Asp Arg Glu Ile Arg Ile Tyr Thr Asp Ala
450 455 460

Gly Arg Ile Cys Arg Pro Leu Leu Ile Ala Lys Asn Gly Ser Leu Leu
465 470 475 480

Leu Lys Lys Glu His Ile Asp Met Leu Lys Glu Arg Glu Tyr Asn Asn
485 490 495

Tyr Gly Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Gly Val Val Glu Tyr Ile Asp
500 505 510

Thr Leu Glu Glu Glu Thr Val Met Ile Ala Met Ser Pro Asp Asp Leu
515 520 525

Listado secuencias.txt

Arg Gln Asp Lys Glu Cys Ala Tyr Cys Thr Thr Tyr Thr His Cys Glu
530 535 540

Ile His Pro Ala Met Ile Leu Gly Val Cys Ala Ser Ile Ile Pro Phe
545 550 555 560

Pro Asp His Asn Gln Ser Pro Arg Asn Thr Tyr Gln Ser Ala Met Gly
565 570 575

Lys Gln Ala Met Gly Val Tyr Ile Thr Asn Phe His Val Arg Met Asp
580 585 590

Thr Leu Ala His Val Leu Tyr Tyr Pro His Lys Pro Leu Val Thr Thr
595 600 605

Arg Ser Met Glu Tyr Leu Arg Phe Arg Glu Leu Pro Ala Gly Ile Asn
610 615 620

Ser Ile Val Ala Ile Ala Cys Tyr Thr Gly Tyr Asn Gln Glu Asp Ser
625 630 635 640

Val Ile Leu Asn Ala Ser Ala Val Glu Arg Gly Phe Phe Arg Ser Val
645 650 655

Phe Tyr Arg Ser Tyr Lys Asp Ala Glu Ser Lys Arg Ile Gly Asp Gln
660 665 670

Glu Glu Gln Phe Glu Lys Pro Thr Arg Gln Thr Cys Gln Gly Met Arg
675 680 685

Asn Ala Leu Tyr Asp Lys Leu Asp Asp Asp Gly Ile Ile Ser Pro Gly
690 695 700

Ile Arg Val Ser Gly Asp Asp Val Val Ile Gly Lys Thr Met Thr Leu
705 710 715 720

Pro Glu Asn Asp Asp Glu Leu Asp Gly Asn Thr Lys Lys Phe Thr Lys
725 730 735

Arg Asp Ala Ser Thr Phe Leu Arg Asn Ser Glu Thr Gly Val Val Asp
740 745 750

Gln Val Met Leu Thr Leu Asn Ser Glu Gly Tyr Lys Phe Cys Lys Ile

Listado secuencias.txt

755	760	765
Arg Val Arg Ser Val Arg Ile Pro Gln Ile Gly Asp Lys Phe Ala Ser		
770	775	780
Arg His Gly Gln Lys Gly Thr Cys Gly Ile Gln Tyr Arg Gln Glu Asp		
785	790	800
Met Ile Phe Ser Cys Glu Gly Leu Thr Pro Asp Ile Ile Ile Asn Pro		
	805	810
His Ala Ile Pro Ser Arg Met Thr Ile Gly His Leu Ile Glu Cys Ile		
	820	825
Gln Gly Lys Val Ser Ala Asn Lys Gly Glu Ile Gly Asp Ala Thr Pro		
	835	840
Phe Asn Asp Ala Val Asn Val Gln Lys Ile Ser Thr Leu Leu Gln Glu		
	850	855
Tyr Gly Tyr Gln Leu Arg Gly Asn Glu Val Met Tyr Asn Gly His Thr		
865	870	875
Gly Arg Lys Met Asn Ala Gln Ile Phe Leu Gly Pro Thr Tyr Tyr Gln		
	885	890
Arg Leu Lys His Met Val Asp Asp Lys Ile His Ser Arg Ala Arg Gly		
	900	905
Pro Val Gln Ile Leu Val Arg Gln Pro Met Glu Gly Arg Ala Arg Asp		
	915	920
Gly Gly Leu Arg Phe Gly Glu Met Glu Arg Asp Cys Gln Ile Ser His		
	930	935
Gly Ala Ala Gln Phe Leu Arg Glu Arg Leu Phe Glu Val Ser Asp Pro		
945	950	955
Tyr Arg Ile His Val Cys Asn Phe Cys Gly Leu Ile Ala Ile Ala Asn		
	965	970
Leu Arg Asn Asn Thr Phe Glu Cys Lys Gly Cys Lys Asn Lys Thr Gln		
	980	985
		990

Listado secuencias.txt

Ile Ser Gln Thr Trp Ile Leu
995

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 81
I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 3673
II.- TIPO DE MOLÉCULA: ADN
VI.- FUENTE ORIGINAL
(A) ORGANISMO: *Meligethes aeneus*

SECUENCIA SEQ ID No: 81
cagattaaat cgcttttcgg cggttgtgct tgtgttttta tttttgtgac tttaaagatg 60
tatgatcaag atgaagagca atatgaggag gaagacgcgg aagaaattag ttccgaattg 120
tggcaggaag cctgtttgat cgttataaac gcgtatttcg acgagaaagg cctggtacgg 180
caacaattgg acagtttcga tgagttcatt cagatgtctg tgcagagaat cgtggaggat 240
tccccgcaaa tcgatttggt ggcagaggcg cagcacacgt cgggagaagt ggaaaacccc 300
ccgcgatatt tgctgaaatt cgagcagatt tacctttcga agcccacgca ttgggagaaa 360
gacggggccc cgtcccctat gatgcccaac gaggccagac tgagaaattt gacgtactct 420
gcacctcttt acgtggacat aacgaagact atcgtaagg agggcgaaga tcctgtcgag 480
accaacacc agaagacttt catagggaaa atcccgatta tgttgaggtc tacgtactgc 540
cttctcagcg gcttaacaga tcgtgatttg acggagttaa acgagtgtcc tttggatccc 600
gggggttatt tcatcataaa cgggtcggag aaggttttta ttgcccagga aaaaatggct 660
acgaacacag tgtatgtgtt ttcgatgaag gacgggaaat acgcgtttta atccgagatt 720
aggtcgtgtt tggagcattc ttcgcgcccc acctccactt tgtgggtgaa tatgatggct 780
cgtggcgggc aagctgtgaa aaaggcagcc atcgggcaaa gaatcatcgc tattttacca 840
tatatcaagc aagaaatacc cattatgac gtattcagag cgctaggttt tgtggccgac 900
agagacatcc tcgaacacat catctatgac tttagcagacc ctgaaatgat ggagatggtg 960
aaaccgtccc tagacgaggc ttttgtaatc caagagcagg gtgtggcctt gaattttatt 1020
ggtgctagag gggccaggcc cggcgtaacg agggaaaagc gtgttaaata cgccagggaa 1080
attttgcaga aggaaatgct gccgcatgta ggagtttccg atttctgtga aacaaaaaa 1140
gcgtatttct tggggtacat ggtgcacagg ctgcttctgg cctctttggg gcgcagagag 1200
ttagacgaca gggatcatta cggcaacaaa aggttggatt tggctgggccc gttgctggct 1260
ttcttgttca gaggtctttt caaaaaccta atgaaggaag tgcgaatgta cgcccaaaaa 1320
ttcatcgaca gaggaaaaga tttcaacttg gatttggcaa tcaaaaccaa actcatcacc 1380
gacggtttgc gttactctct tgccaccggt aactggggcg accagaaaaa ggcccatcaa 1440

Listado secuencias.txt

gccagagccg gagtgtctca ggtattgaac agactgactt acgcctcgac tttatctcat	1500
ttgaggcgcg taaactcgcc catcggtcgc gacggtaaata tagccaaacc ccgtcagttg	1560
cacaacaccc tgtggggcat gatttgcccg gcggaaacgc cagagggcgcg tgcgggtgggt	1620
ttggtaaaaa atctcgccct tatggcttac atttccgtcg gttcgcaacc ttctccgatc	1680
ttggagttct tggaggagt gtcgatggag aatttgagg aaatagcgcc gtctgctatc	1740
gctaacgcca ctaagatttt tgtcaatggg tggtgggtcg gtattcacag ggatccggag	1800
caattgacgg cgactttgag gaaactacgt cgccagatgg atattatcgt atccgaggta	1860
tccatgatcc gtgatatccg cgatcgcgaa atccgtatct acacggatgc tggtcgcatt	1920
tgcagacctt tattgatcgc caaaaatggc agcctgttac ttaaaaaaga acacatcgac	1980
atgttaaaaag agagagaata caacaactat ggctggcaag tggtggtagc ctcagggtgtt	2040
gtcgaataca ttgacaccct agaggaagaa actgtgatga ttgccatgtc tcctgacgat	2100
ttgagacaag acaaggagt ggcctactgt acgacttaca ctactgcga aattcatccc	2160
gccatgattt tgggagtctg cgcgtcaatt atcccgttcc ccgatcaca ccaaagtccc	2220
aggaacacct atcaaagcgc catgggaaaa caagccatgg gcgtgtacat aacaaacttc	2280
cacgtgcgga tggacacgct cgcgcacgtg ctctactacc ctacaaaacc gctggtaacc	2340
accagatcca tggagtacct ccggttcaga gagctccccg ccggcatcaa cagcatcgtg	2400
gccatcgctt gctacaccgg ctacaaccag gaggattcgg ttatttttaa cgcttcggcc	2460
gtcgaagag gcttcttccg atcgggtgtt tatcggtcgt acaaggacgc cgagtccaag	2520
cgcattgggg atcaggagga gcagttcgag aagccgacca ggcagacctg ccagggcatg	2580
cggaacgcgc tgtacgacaa actcgacgac gacggatatca tttcgcccgg tattcgtgtc	2640
tccggtgacg acgtcgtcat cggcaaaacc atgacgctcc cggagaacga tgatgagctg	2700
gacggtaaca cgaagaagtt caccaagagg gacgccagta ctttcttgcg taacagcgag	2760
actggcgtgg tggatcaggt gatgttgacg ttgaactccg aggggttaca gttctgcaag	2820
atccgcgtga ggtccgtgag gattccgcag atcggcgaca agttcgctc gcgtcacggg	2880
cagaagggta cttgcggcat acagtaccgg caagaagata tgattttctc gtgcgagggt	2940
ttgaccccg acatcatcat caaccgcac gccatcccat ctcgatgac gattgggcat	3000
ttgatcgagt gcatccaagg taaggatatc gcgaataagg gggagatcgg ggacgcgacc	3060
ccgtttaacg acgcggtaaa cgtgcagaaa atttccactc tcctgcaaga gtacgggtac	3120
caactgagag ggaacgaggt gatgtacaac gggcacacgg ggcgcaaat gaacgcgcag	3180

Listado secuencias.txt

atcttcctgg gccccaccta ctaccagcgc ctcaagcaca tggaggacga caagatccac	3240
tcgagggcca gagggccggt gcagatcctc gtcaggcagc ccatggaggg tcgagccagg	3300
gacggggggcc tgcgttttcgg ggagatggag cgcgattgcc agatttcgca cggcgcgggcg	3360
cagtttctgc gcgagcgctt gttcgaggtg tccgatccct acaggatcca cgtgtgcaac	3420
ttctgcgggc tgatcgccat cgccaacttg cggaacaaca cgttcgagtg caaggggtgc	3480
aagaataaga cgcagatttc gcaggtcaag ttgccttacg ccgctaagtt gctcttccaa	3540
gagctgatgt cgatgaatat cgccccaga ttgatggtct tataaaaagt ttattttatg	3600
tattaggtat tagaatttag ttttgattg attttatgtg actatgatac cactaaaata	3660
aatataaata caa	3673

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No: 82
 I. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 1194
 II.- TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA
 VI.- FUENTE ORIGINAL
 (A) ORGANISMO: *Meligethes aeneus*

SECUENCIA SEQ ID No: 82

Gln	Ile	Lys	Ser	Leu	Phe	Gly	Gly	Cys	Ala	Cys	Val	Phe	Ile	Phe	Val
1				5					10					15	
Thr	Leu	Lys	Met	Tyr	Asp	Gln	Asp	Glu	Glu	Gln	Tyr	Glu	Glu	Glu	Asp
			20					25					30		
Ala	Glu	Glu	Ile	Ser	Ser	Glu	Leu	Trp	Gln	Glu	Ala	Cys	Trp	Ile	Val
		35					40					45			
Ile	Asn	Ala	Tyr	Phe	Asp	Glu	Lys	Gly	Leu	Val	Arg	Gln	Gln	Leu	Asp
	50					55					60				
Ser	Phe	Asp	Glu	Phe	Ile	Gln	Met	Ser	Val	Gln	Arg	Ile	Val	Glu	Asp
65					70					75				80	
Ser	Pro	Gln	Ile	Asp	Leu	Val	Ala	Glu	Ala	Gln	His	Thr	Ser	Gly	Glu
				85					90					95	
Val	Glu	Asn	Pro	Pro	Arg	Tyr	Leu	Leu	Lys	Phe	Glu	Gln	Ile	Tyr	Leu
			100					105					110		
Ser	Lys	Pro	Thr	His	Trp	Glu	Lys	Asp	Gly	Ala	Pro	Ser	Pro	Met	Met
		115					120					125			

Listado secuencias.txt

Pro Asn Glu Ala Arg Leu Arg Asn Leu Thr Tyr Ser Ala Pro Leu Tyr
130 135 140

Val Asp Ile Thr Lys Thr Ile Val Lys Glu Gly Glu Asp Pro Val Glu
145 150 155 160

Thr Gln His Gln Lys Thr Phe Ile Gly Lys Ile Pro Ile Met Leu Arg
165 170 175

Ser Thr Tyr Cys Leu Leu Ser Gly Leu Thr Asp Arg Asp Leu Thr Glu
180 185 190

Leu Asn Glu Cys Pro Leu Asp Pro Gly Gly Tyr Phe Ile Ile Asn Gly
195 200 205

Ser Glu Lys Val Leu Ile Ala Gln Glu Lys Met Ala Thr Asn Thr Val
210 215 220

Tyr Val Phe Ser Met Lys Asp Gly Lys Tyr Ala Phe Lys Ser Glu Ile
225 230 235 240

Arg Ser Cys Leu Glu His Ser Ser Arg Pro Thr Ser Thr Leu Trp Val
245 250 255

Asn Met Met Ala Arg Gly Gly Gln Ala Val Lys Lys Ala Ala Ile Gly
260 265 270

Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Pro Tyr Ile Lys Gln Glu Ile Pro Ile
275 280 285

Met Ile Val Phe Arg Ala Leu Gly Phe Val Ala Asp Arg Asp Ile Leu
290 295 300

Glu His Ile Ile Tyr Asp Phe Asp Asp Pro Glu Met Met Glu Met Val
305 310 315 320

Lys Pro Ser Leu Asp Glu Ala Phe Val Ile Gln Glu Gln Gly Val Ala
325 330 335

Leu Asn Phe Ile Gly Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Val Thr Arg Glu
340 345 350

Lys Arg Val Lys Tyr Ala Arg Glu Ile Leu Gln Lys Glu Met Leu Pro
355 360 365

Listado secuencias.txt

His Val Gly Val Ser Asp Phe Cys Glu Thr Lys Lys Ala Tyr Phe Leu
370 375 380

Gly Tyr Met Val His Arg Leu Leu Leu Ala Ser Leu Gly Arg Arg Glu
385 390 395 400

Leu Asp Asp Arg Asp His Tyr Gly Asn Lys Arg Leu Asp Leu Ala Gly
405 410 415

Pro Leu Leu Ala Phe Leu Phe Arg Gly Leu Phe Lys Asn Leu Met Lys
420 425 430

Glu Val Arg Met Tyr Ala Gln Lys Phe Ile Asp Arg Gly Lys Asp Phe
435 440 445

Asn Leu Asp Leu Ala Ile Lys Thr Lys Leu Ile Thr Asp Gly Leu Arg
450 455 460

Tyr Ser Leu Ala Thr Gly Asn Trp Gly Asp Gln Lys Lys Ala His Gln
465 470 475 480

Ala Arg Ala Gly Val Ser Gln Val Leu Asn Arg Leu Thr Tyr Ala Ser
485 490 495

Thr Leu Ser His Leu Arg Arg Val Asn Ser Pro Ile Gly Arg Asp Gly
500 505 510

Lys Leu Ala Lys Pro Arg Gln Leu His Asn Thr Leu Trp Gly Met Ile
515 520 525

Cys Pro Ala Glu Thr Pro Glu Gly Ala Ala Val Gly Leu Val Lys Asn
530 535 540

Leu Ala Leu Met Ala Tyr Ile Ser Val Gly Ser Gln Pro Ser Pro Ile
545 550 555 560

Leu Glu Phe Leu Glu Glu Trp Ser Met Glu Asn Leu Glu Glu Ile Ala
565 570 575

Pro Ser Ala Ile Ala Asn Ala Thr Lys Ile Phe Val Asn Gly Cys Trp
580 585 590

Val Gly Ile His Arg Asp Pro Glu Gln Leu Thr Ala Thr Leu Arg Lys

Listado secuencias.txt

595

600

605

Leu Arg Arg Gln Met Asp Ile Ile Val Ser Glu Val Ser Met Ile Arg
610 615 620

Asp Ile Arg Asp Arg Glu Ile Arg Ile Tyr Thr Asp Ala Gly Arg Ile
625 630 635 640

Cys Arg Pro Leu Leu Ile Ala Lys Asn Gly Ser Leu Leu Leu Lys Lys
645 650 655

Glu His Ile Asp Met Leu Lys Glu Arg Glu Tyr Asn Asn Tyr Gly Trp
660 665 670

Gln Val Leu Val Ala Ser Gly Val Val Glu Tyr Ile Asp Thr Leu Glu
675 680 685

Glu Glu Thr Val Met Ile Ala Met Ser Pro Asp Asp Leu Arg Gln Asp
690 695 700

Lys Glu Cys Ala Tyr Cys Thr Thr Tyr Thr His Cys Glu Ile His Pro
705 710 715 720

Ala Met Ile Leu Gly Val Cys Ala Ser Ile Ile Pro Phe Pro Asp His
725 730 735

Asn Gln Ser Pro Arg Asn Thr Tyr Gln Ser Ala Met Gly Lys Gln Ala
740 745 750

Met Gly Val Tyr Ile Thr Asn Phe His Val Arg Met Asp Thr Leu Ala
755 760 765

His Val Leu Tyr Tyr Pro His Lys Pro Leu Val Thr Thr Arg Ser Met
770 775 780

Glu Tyr Leu Arg Phe Arg Glu Leu Pro Ala Gly Ile Asn Ser Ile Val
785 790 795 800

Ala Ile Ala Cys Tyr Thr Gly Tyr Asn Gln Glu Asp Ser Val Ile Leu
805 810 815

Asn Ala Ser Ala Val Glu Arg Gly Phe Phe Arg Ser Val Phe Tyr Arg
820 825 830

Listado secuencias.txt

Ser Tyr Lys Asp Ala Glu Ser Lys Arg Ile Gly Asp Gln Glu Glu Gln
835 840 845

Phe Glu Lys Pro Thr Arg Gln Thr Cys Gln Gly Met Arg Asn Ala Leu
850 855 860

Tyr Asp Lys Leu Asp Asp Asp Gly Ile Ile Ser Pro Gly Ile Arg Val
865 870 875 880

Ser Gly Asp Asp Val Val Ile Gly Lys Thr Met Thr Leu Pro Glu Asn
885 890 895

Asp Asp Glu Leu Asp Gly Asn Thr Lys Lys Phe Thr Lys Arg Asp Ala
900 905 910

Ser Thr Phe Leu Arg Asn Ser Glu Thr Gly Val Val Asp Gln Val Met
915 920 925

Leu Thr Leu Asn Ser Glu Gly Tyr Lys Phe Cys Lys Ile Arg Val Arg
930 935 940

Ser Val Arg Ile Pro Gln Ile Gly Asp Lys Phe Ala Ser Arg His Gly
945 950 955 960

Gln Lys Gly Thr Cys Gly Ile Gln Tyr Arg Gln Glu Asp Met Ile Phe
965 970 975

Ser Cys Glu Gly Leu Thr Pro Asp Ile Ile Ile Asn Pro His Ala Ile
980 985 990

Pro Ser Arg Met Thr Ile Gly His Leu Ile Glu Cys Ile Gln Gly Lys
995 1000 1005

Val Ser Ala Asn Lys Gly Glu Ile Gly Asp Ala Thr Pro Phe Asn
1010 1015 1020

Asp Ala Val Asn Val Gln Lys Ile Ser Thr Leu Leu Gln Glu Tyr
1025 1030 1035

Gly Tyr Gln Leu Arg Gly Asn Glu Val Met Tyr Asn Gly His Thr
1040 1045 1050

Gly Arg Lys Met Asn Ala Gln Ile Phe Leu Gly Pro Thr Tyr Tyr
1055 1060 1065

Listado secuencias.txt

Gln	Arg	Leu	Lys	His	Met	Val	Asp	Asp	Lys	Ile	His	Ser	Arg	Ala
1070						1075					1080			
Arg	Gly	Pro	Val	Gln	Ile	Leu	Val	Arg	Gln	Pro	Met	Glu	Gly	Arg
1085						1090					1095			
Ala	Arg	Asp	Gly	Gly	Leu	Arg	Phe	Gly	Glu	Met	Glu	Arg	Asp	Cys
1100						1105					1110			
Gln	Ile	Ser	His	Gly	Ala	Ala	Gln	Phe	Leu	Arg	Glu	Arg	Leu	Phe
1115						1120					1125			
Glu	Val	Ser	Asp	Pro	Tyr	Arg	Ile	His	Val	Cys	Asn	Phe	Cys	Gly
1130						1135					1140			
Leu	Ile	Ala	Ile	Ala	Asn	Leu	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Glu	Cys	Lys
1145						1150					1155			
Gly	Cys	Lys	Asn	Lys	Thr	Gln	Ile	Ser	Gln	Val	Lys	Leu	Pro	Tyr
1160						1165					1170			
Ala	Ala	Lys	Leu	Leu	Phe	Gln	Glu	Leu	Met	Ser	Met	Asn	Ile	Ala
1175						1180					1185			
Pro	Arg	Leu	Met	Val	Leu									
1190														

RESUMEN

5 Esta descripción se refiere a moléculas de ácido
nucleico y métodos de uso de los mismos para control de
plagas de coleópteros mediante la interferencia de ARN
mediada por inhibición de la codificación objetivo y
transcrito en secuencias sin codificación en plagas de
10 coleópteros. La descripción también se refiere a métodos para
la fabricación de plantas transgénicas que expresa moléculas
de ácido nucleico útiles para el control de plagas de
coleópteros y las células de plantas y plantas obtenidas por
los mismos.

15

20

25

Figura 1. Generación de ARNs a partir de una plantilla de transcripción individual

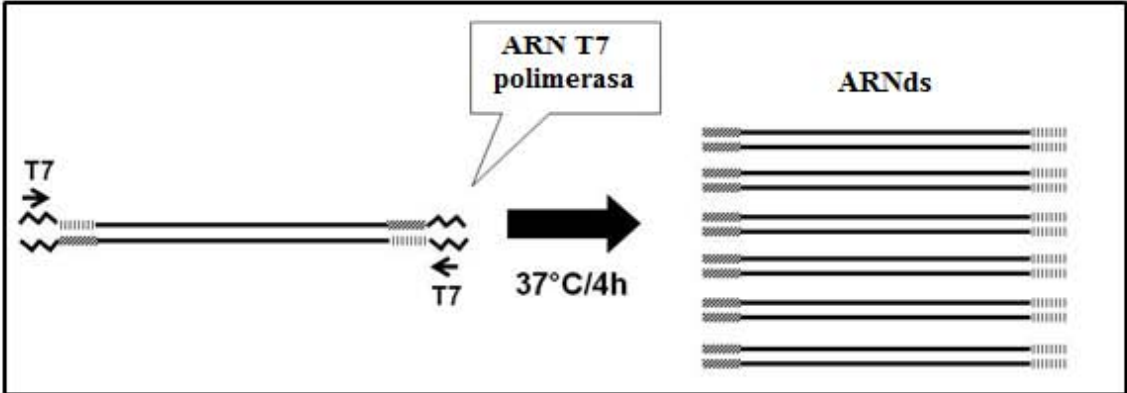


Figura 2. Generación de ARNs a partir de dos plantillas

