los inventores no tienen derecho a preceder 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

Ejemplo 1
Identificación de Genes objetivo candidato

Múltiples etapas de desarrollo de WCR (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) fueron seleccionadas para que la generación de transcriptoma combinada proporcione secuencias de genes objetivo candidatas para controlar por tecnología de resistencia del insecto de planta transgénica ARNi.

En una ejemplificación, el 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 método a base de fenol/TRI REAGENT® (MOLECULAR RESEARCH CENTER, Cincinnati, OH):

Las larvas se homogeneizaron a temperatura ambiente en un homogeneizador de 15 mL con 10 mL de TRI REAGENT® 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 dejar la extracción reposar a temperatura ambiente durante 10 min, las fases fueron separadas por centrifugación a 12,000 x g a 4 °C. La fase superior (compuesta de alrededor de 0,6 mL) fue transferida cuidadosamente en otro tubo estéril de 1,5 mL y se agregó un volumen de isopropanol de igual temperatura. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 5 a 10 min, la mezcla se centrifugó por 8 min a 12,000 x g (4 °C o 25 °C).

El sobrenadante fue quitado cuidadosamente y descartado, y el comprimido del ARN se lavó dos veces mediante agitación 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 retirado cuidadosamente, se dejó secar el sedimento mediante secado al aire 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 extracción típica de aproximadamente 0,9 gm de larvas rindió más de 1 mg del ARN 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

autoclave Tampón TAE X 10 (acetato de Tris EDTA; 1 X 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. 1 X TAE fue utilizado como el tampón de corriente. Antes de usarlo, el tanque de electroforesis y el peine formador de cavidades fueron limpiadas con RNasa AWAY® (INVITROGEN INC., Carlsbad, CA). Dos µL de muestra del ARN se mezclaron con 8 µL de tampón TE (10 mM Tris HCl pH 7,0; 1 mM EDTA) y 10 µL de tampón de muestra de ARN (NOVAGEN® Catálogo No 70606; EMD4 Bioscience, Gibbstown, NJ). La muestra se calentó a 70 °C durante 3 min., enfriado a temperatura ambiente, y 5 µL (contiene 1 µg de 2 µg ARN) fueron cargados por pocillo. Los marcadores de peso molecular del ARN comercialmente disponibles se corrieron simultáneamente en pocillos separados para la comparación de tamaño molecular. Se corrió el gel a 60 voltios durante 2 h.

Una biblioteca de ADNc normalizada fue preparada a partir del 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. Se ensamblaron 350,000 lecturas en más de 50,000 cóntigos. Tanto las lecturas desmontadas y los cóntigos

fueron convertidos en bases de datos de BLASTable usando el programa disponible públicamente, FORMATDB (disponible en NCBI).

Las bibliotecas de ARN total y 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 Hemipteran. Estos genes se presume que son esenciales para la supervivencia y el crecimiento de los insectos hemípteros o de coleópteros. Los homólogos de genes objetivo seleccionados se identificaron en la base de datos de secuencia de transcriptoma como se describe a continuación. Las secuencias completas o parciales de los genes objetivo fueron amplificadas por PCR para preparar plantillas para la producción de ARN (ARNds)en cadena doble.

Se realizaron las búsquedas de TBLASTN usando secuencias de codificación de proteínas candidato contra las bases de datos BLASTable que contienen las lecturas de secuencia *Diabrotica* desmontadas o los cóntigos montados. Se confirmaron golpes importantes a una secuencia de *Diabrotica* (definida como mejor que e^{-20} para homologías de cóntigos y

mejor que e^{-10} para las homologías de lecturas de secuencia desmontada) 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 incluían genes de *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 candidatos hemípteros 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 algunas de las lecturas de cóntigos Diabrotica o secuencias no montadas seleccionadas por homología a un gen candidado no Diabrotica superpuesto y que el ensamblaje de los cóntigos no se ha unido a estos traslapos. En esos casos, SEQUENCHER® v4.9 (GENE CODES CORPORATION, Ann Arbor, MI) fue utilizado para montar las secuencias en cóntigos más largas.

Un gen candidato objetivo que codifica Diabrotica rop (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.

Genes con homología a WCR rop

ROP contiene un dominio conservado de la familia Sec1 (pfam00995). Las proteínas de familias Sec1 son

conocidas por estar involucrados en la transmisión sináptica y secreción general. Otras proteínas de *Diabrotica virgifera* que también contienen este dominio pueden compartir propiedades estructurales y/o funcionales y por lo tanto un gen que codifica una de estas proteínas puede abarcar un gen diana candidato que puede llevar a la mortalidad de las plagas de coleópteros, la inhibición del crecimiento, la inhibición del desarrollo o la inhibición de la reproducción en WCR.

En *Drosophila melanogaster*, los genes que codifican Ras y Ras opuestas (rop) se transcriben de forma divergente de un promotor bidireccional (Harrison et al., (1995) genético 139:1701 1709). La proteína ROP 68 kDa comparte homología de secuencia con Saccharomyces cerevisiae las proteínas SLT1, SEC1 y SLP1, todos los cuales están involucrados en el tráfico de vesículas entre compartimentos celulares de levadura (Salzberg et al., (1993) desarrollo 117:1309 1319). Además, ROP regula la liberación de neurotransmisores de manera dependiente de la dosis (Wu et al., (1998) EMBO Journal 17:127 139). Los transgenes de ARNds ROP pueden combinarse con otras moléculas de ARNds para proporcionar una focalización redundante en ARNi y efectos sinérgicos de ARNi. Los eventos de maíz transgénico expresando ARNds que se enfoca en rop son útiles para prevenir daños de alimentación de la raíz por crisomelas del maíz. Los transgenes de ARNds rop representan nuevos modos de

acción para combinar con la tecnología de proteína de insecticida Bacillus thuringiensis en las pirámides de gen de manejo de la resistencia del insecto para mitigar contra el desarrollo de las poblaciones de crisomela de maíz resistentes a cualquiera de estas tecnologías de control de la crisomela.

Se utilizron clones de longitud total o parcial de secuencias de genes candidatos *Diabrotica*, *rop* para generar amplicones PCR para síntesis de ARNds.

La SEQ ID NO: 1 muestra una secuencia de ADN 4816 bp de *Diabrotica rop*.

La SEQ ID NO: 3 muestra una secuencia de ADN 392 bp de *rop* reg1.

La SEQ ID NO: 4 muestra una secuencia de ADN 627 bp *rop* reg2.

La SEQ ID NO: 114 muestra una secuencia de ADN 201 bp de *rop* v3.

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 y SEQ ID NOs: 112 y 113). Cuando proceda, una secuencia de promotor de fago T7 (TTAATACGACTCACTATAGGGAGA; SEQ ID NO: 5) se incorporó en los

extremos 5' de las hebras de sentido o antisentido amplificado. 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. El ARNds también fue amplificado de un clon de ADN que comprende la región codificante para una proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEQ ID NO: 6; Shagin et al. (2004) *J. Mol.* Biol. Evol. 21 (5) :85841, (50)).

Tabla 1. Cebadores y pares de cebadores utilizados para amplificar las porciones de las regiones de codificación de gen objetivo *rop* ejemplar y gen de control negativo de YFP.

	Id. del Gen	Id. del Cebador	SEQ ID NO:	Secuencia
Par 1	*rop* reg1	ROP-F1T7	7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAaccatggcgttaaagaaccaag
		ROP–R1T7	8	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGGTGGTGGCACAAGGTACT
Par 2	*rop* reg2	ROP-F2T7	9	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTCGACCGAGGTTTCGAC
		ROP–R2T7	10	TTAATACGACTCACTATAGGGAGATAACTGAAGGTTGGCGATGGTC
Par 3	YFP	YFP-F_T7	11	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAcaccatgggctccagcggcgccc
		YFP-R_T7	12	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAagatcttgaaggcgctcttcagg

Ejemplo 3

Construcciones ARNi

Preparación de plantilla por síntesis PCR y ARNds. Una estrategia utilizada para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNds YFP y ROP se muestra en la FIG. 1. La plantilla ADNs destinada al uso en la síntesis de ARNds rop fueron preparados por PCR utilizando los pares del cebador en la tabla 1 y (como plantilla de PCR) la primera hebra de ADNc preparada a partir de ARN total aislado de las larvas de WCR de primer estadio. Para cada rop seleccionado y región de gen YFP objetivo, las amplificaciones de PCR introdujeron una secuencia promotora T7 en los extremos 5' de las hebras de sentido y antisentido amplificado (el segmento YFP fue amplificado de un clon de ADN de la región de codificación de YFP). Los dos fragmentos de PCR amplificados para cada región de 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. 1. Las secuencias de las plantillas de ARNds amplificadas con los pares de cebador particular fueron: SEQ ID NO: 3 (reg1 rop), SEQ ID NO: 4 (rop reg2), SEQ ID NO: 114 (rop v3) y YFP (SEQ ID NO: 6). El ARN de doble cadena para bioensayos de insecto fue sintetizado y purificado usando un equipo de ARNi AMBION® MEGASCRIPT® 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. Los Vectores de entrada (pDAB112649 y pDAB115766) albergando un constructo gen objetivo para la formación de la horquilla que abarca segmentos de RP (SEQ ID NO: 1) fueron ensamblados utilizando una combinación de fragmentos sintetizados químicamente (DNA2.0, Menlo Park, CA) y métodos 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 segmentos están separados por una secuencia de intrón ST LS1 (SEQ ID NO: 16) (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 rop como repeticiones invertidas grandes uno del otro, separados por la secuencia del intrón. Una copia de un promotor de ubiquitina maíz 1 (patente estadounidense 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 3' UTR v2; patente estadounidense N° 6.699.984) fue utilizado para terminar la transcripción del gen que expresa horquillas

de ARN.

El vector de entrada PDAB112649 se compone de un constructo de horquilla ARN del v1 rop (SEQ ID NO: 13) que se compone de un segmento de la rop (SEQ ID NO: 1)

El vector de entrada pDAB115766 se comprende de un constructo de horquilla de ARN del v3 rop (SEQ ID NO: 14) que se compone de un segmento de la rop (SEQ ID NO: 1) distinto del que se encuentra en pDAB112649.

Los vectores de entrada pDAB112649 y pDAB115766 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 rop hairpin ARN para Agrobacterium mediada por las transformaciones de maíz embrión (pDAB114515 y pDAB115770), respectivamente).

Un vector binario de control negativo, pDAB110853, que comprende un gen que expresa un YFP horquilla ARNds, 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: 15) 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 (aryloxyalknoate dioxygenase; AAD 1 v3) (patente estadounidense N° 7838733(B2) y Wright et al. Proc. Natl. Acad. Sci. ESTADOS UNIDOS 107:20240 5) bajo la regulación de la caña de azúcar baciliforme badnavirus (ScBV) promotora (Schenk et al. (1999) planta Molec. Biol. 39:1221 30). Una secuencia sintética 5' UTR 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 región 3' no traducida de un gen de la lipasa maíz (ZmLip 3' UTR; patente estadounidense 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 YFP, se construyó mediante reacciones de recombinación GATEWAY® estándar con un vector binario de destino típico (pDAB9989) y un vector de entrada pDAB100287. El vector binario de destino PDAB9989 se compone de un gen de resistencia a herbicidas (ariloxialcanoato dioxigenasa; AAD-1 v3) (como arriba) bajo la regulación 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 la lipasa maíz (ZmLip 3' UTR; como arriba). El vector de entrada PDAB100287 comprende una región de codificación YFP

(SEQ ID NO: 17) bajo el control de 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: 13 presenta una secuencia formadora una horquilla de ARN rop vi de *Diabrotica virgifera* como se encuentra en pDAB114515.

SEQ ID NO: 14 presenta una secuencia formadora de horquilla de ARN rop v3 de *Diabrotica virgifera* como se encuentra en pDAB115770.

Ejemplo 4

Bioensayos de Dieta de Insectos

Preparación de muestra y bioensayos.

Un número de moléculas de ARNds (incluyendo los correspondientes a rop reg1 (SEQ ID NO: 3), rop reg2 (SEQ ID NO: 4) y rop v3 (SEQ ID NO: 114) se sintetizaron y purificaron usando un kit de ARNi MEGASCRIPT®. Las moléculas de ARNds purificadas se prepararon en un tampón TE, y todos los bioensayos contenían un tratamiento de control que consiste en este tampón, el cual sirvió como una verificación de antecedentes para la inhibición de mortalidad o el crecimiento de WCR (Diabrotica virgifera virgifera LeConte). Se midieron las concentraciones de las moléculas de ARNds en el tampón de bioensayo usando un espectrofotómetro NANODROP®

8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE).

Las muestras se sometieron a pruebas de actividad de los insectos en las pruebas biológicas realizadas con larvas de insecto recién nacido en dieta artificial de insectos. Los huevos de 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 contenía aproximadamente 1,0 mL de una dieta artificial diseñada para el crecimiento de los insectos de coleópteros. Una alícuota de 60 µL de muestra de ARNds fue entregada con pipeta sobre la superficie de la dieta de cada pocillo (40 µL/cm^2). Se calcularon las concentraciones de muestra de ARNds como la cantidad de ARNds por centímetro cuadrado (ng/cm^2) del área de superficie (1,5 cm^2) en el pozo. Las bandejas tratadas se mantuvieron en una campana de humos hasta que el líquido en la superficie de la dieta se evaporó o fue absorbido por la dieta.

Pocas horas después de la eclosión, las larvas individuales fueron recogidas con un cepillo de pelo de camello humedecido y depositadas sobre la dieta tratada (una o dos larvas por pocillo). Los pocillos infestados de las bandejas de plástico de 128 pocillos fueron sellados con hojas adhesivas de plástico transparente y ventilados para permitir el intercambio de gases. 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 lo cual se registró el número total de insectos expuestos a cada muestra, el número de insectos muertos y el peso de los insectos que sobrevivieron. Se calculó el porcentaje promedio de mortalidad y la inhibición del crecimiento promedio para cada tratamiento. La Inhibición del crecimiento (GI) se calculó de la siguiente manera:

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

donde TWIT es el Peso Total de Insectos vivos en el Tratamiento;

TNIT es el Número Total de Insectos en el tratamiento;

TWIBC es el Peso Total de Insectos Vivos en la Verificación de Antecedentes (control del tampón); y

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

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

LC_{50} (concentración letal) se define como la dosis en la que 50% de los insectos de prueba son asesinados. GI_{50} (inhibición del crecimiento) se define como la dosis en el cual el crecimiento promedio (p. Ej. de peso vivo) de los insectos de prueba es el 50% del valor promedio visto en las muestras de la Verificación de Antecedentes.

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

Ejemplo 5

Selección de candidatos de genes objetivo

El ARNds sintético diseñado para inhibir las secuencias de genes objetivo identificadas en el Ejemplo 1 causa la inhibición del crecimiento y de la mortalidad cuando se administra a WCR en ensayos a base de dieta. Se observó que *rop* reg1, *rop* reg2 y *rop* v3 exhibían una mayor eficacia en este ensayo que otros ARNds seleccionados.

Los bioensayos replicados demostraron que la ingestión de preparaciones de ARNds derivados de *rop* reg1, *rop* reg2 y *rop* v3 resultó en la inhibición de la mortalidad y/o del crecimiento de las larvas de la crisomela del maíz. La **Tabla 2** y **Tabla 3** muestran los resultados de los bioensayos de alimentación basada en dieta de larvas de 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 de proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEQ ID NO: 6).

Tabla 2. Resultados de los ensayos de alimentación de *rop* ARNds a base de dieta con las larvas de crisomela del maíz

después de 9 días de alimentación. El análisis ANOVA encontró diferencias significativas en el porcentaje (%) promedio de mortalidad y el porcentaje (%) promedio de inhibición de crecimiento (GI). Los promedios fueron separados mediante la prueba de Tukey Kramer.

Nombre del Gen	Dosis (ng/cm^2)	No. de Filas	Medio (%Mortalidad) ± SEM*	Medio (GI) ± SEM
***rop* reg1**	500	4	83.23 ± 1.75 A	0.90 ± 0.01 A
***rop* reg2**	500	4	86.37 ± 5.54 A	0.88 ± 0.10 A
rop v3	500	14	79.84 ± 4.16 A	0.94 ± 0.02 A
TE**	0	4	13.23 ± 2.81 B	0.00 ± 0.00 B
AGUA	0	4	9.01 ± 2.8 B	0.0 ± 0.00 B
YFP***	500	4	8.82 ± 5.63 B	0.09 ± 0.08 B

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

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

***YFP = Proteína Amarilla Fluorescente

Tabla 3. Resumen de potencia oral de ARNds rop sobre larvas de circulante (ng/cm^2).

Tabla 3. Sumario de la potencia oral de *rop* ARNds en larva WCR (ng/cm^2).

Nombre del Gen	LC_{50}	Rango	GI_{50}	Rango
***rop* reg1**	20.4	13.63 a 30.11	5.91	4.29 a 8.15
***rop* reg2**	29.67	19.32 a 45.41	7.07	2.15 a 23.22
rop v3	25.35	18.46 a 34.47	10.06	6.32 a 16.00

Se ha sugerido previamente que ciertos genes de *Diabrotica spp* pueden explotarse para el control de insectos mediado por ARNi. Ver la publicación de patente estadounidense N° 2007/0124836, que revela 906 secuencias, y la patente estadounidense N° 7.614.924, que revela 9,112 secuencias. Sin embargo, se determinó que muchos genes que se sugirieron eran útiles para el control de insectos mediado por ARNi no son eficaces en el control de *Diabrotica*. También se determinó que las secuencias rop *reg1*, *rop* reg2 y *rop* v3 proporcionan un control superior sorprendente e inesperado de *Diabrotica*, en comparación con otros genes que se sugirió eran útiles para el control de insectos mediado por ARNi.

Por ejemplo, la patente estadounidense N° 7.614.924 sugirió que anexina, spectrin Beta 2 y mtRP L4 eran eficazes en el control de insectos mediado por ARNi. La SEQ ID NO: 18 es la secuencia de ADN de anexina región 1 (Reg 1) y la SEQ ID NO: 19 es la secuencia de ADN de anexina región 2 (2 Reg). La SEQ ID NO: 20 es la secuencia del ADN de la región de Espectrina 2 Beta 1 (Reg 1) y la SEQ ID NO: 21 es la secuencia del ADN de la región de Espectrina 2 Beta 2 (Reg2).La SEQ ID NO: 22 es la secuencia de ADN de mtRP L4 región 1 (Reg 1) y la SEQ ID NO: 23 es la secuencia de ADN de mtRP L4 región 2 (2 Reg). Una secuencia YFP (SEQ ID NO: 6) también fue utilizada para producir ARNds como control negativo.

Cada una de las secuencias antes mencionadas se utilizó para producir ARNds por los métodos del Ejemplo 3. La estrategia utilizada para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNds 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) el ADNc de primera hebra preparado a partir de ARN total aislado de larvas de primer estadio de WCR. (La YFP fue amplificada de un clon de ADN). Para cada región del gen objetivo seleccionado, se realizaron dos amplificaciones de PCR separadas. La primera amplificación de PCR introdujo una secuencia promotora de T7 en el extremo 5' de las hebras de sentido amplificado. La segunda reacción incorporó la secuencia promotora de T7 en los extremos 5' de las hebras antisentidos. Los dos fragmentos de 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**. El ARN en cadena doble fue sintetizado y purificado usando un kit de ARNi AMBION® MEGAscript® 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 fue probado por los mismos métodos de bioensayo a base de dieta descritos anteriormente. La **Tabla 4** muestra las secuencias de los

cebadores usados para producir Anexina Reg1, Anexina Reg2, spectrin Beta 2 Reg1, spectrin Beta 2 Reg2, mtRP Reg1 L4 y moléculas de ARNds mtRP Reg2 L4. Las secuencias de cebador de YFP para uso en el método representado en la **Figura 2.** también aparecen en la **Tabla 4.**La **Tabla 5** presenta los resultados de los ensayos biológicos de alimentación a base de dieta de las larvas WCR después de una exposición de 9 días a estas moléculas de ARNds a base de dieta. Los bioensayos replicados demostraron que la ingestión de estos ARNds no dio lugar a ninguna inhibición de la mortalidad o del 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 porciones de las regiones codificantes de los genes.

	Gen (Región)	Id. del Cebador	SEQ ID NO:	Secuencia
Par 4	Anaxina (Reg 1)	Ann-F1_T7	24	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAG CTCCAACAGTGGTTCCTTATC
	Anaxina (Reg 1)	Ann-R1	25	CTAATAATTCTTTTTTAATGTTCCTGA GG
Par 5	Anaxina (Reg 1)	Ann-F1	26	GCTCCAACAGTGGTTCCTTATC
	Anaxina (Reg 1)	Ann-R1_T7	27	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACT AATAATTCTTTTTTAATGTTCCTGAGG
Par 6	Anaxina (Reg 2)	Ann-F2_T7	28	TTAATACGACTCACTATAGGGAGATT GTTACAAGCTGGAGAACTTCTC
	Anaxina (Reg 2)	Ann-R2	29	CTTAACCAACAACGGCTAATAAGG
Par 7	Anaxina (Reg 2)	Ann-F2	30	TTGTTACAAGCTGGAGAACTTCTC
	Anaxina (Reg 2)	Ann-R2T7	31	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACT TAACCAACAACGGCTAATAAGG
Pair 8	Beta-espect2 (Reg 1)	Betasp2-F1_T 7	32	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAA GATGTTGGCTGCATCTAGAGAA
	Beta-espect2	Betasp2-R1	33	GTCCATTCGTCCATCCACTGCA

	Gen (Región)	Id. del Cebador	SEQ ID NO:	Secuencia
	(Reg 1)			
Par 9	Beta-espect2 (Reg 1)	Betasp2-F1	34	AGATGTTGGCTGCATCTAGAGAA
	Beta-espect2 (Reg 1)	Betasp2-R1_T7	35	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCCATTCGTCCATCCACTGCA
Par 10	Beta-espect2 (Reg 2)	Betasp2-F2_T7	36	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAGATGAACACCAGCGAGAAA
	Beta-espect2 (Reg 2)	Betasp2-R2	37	CTGGGCAGCTTCTTGTTTCCTC
Par 11	Beta-espect2 (Reg 2)	Betasp2-F2	38	GCAGATGAACACCAGCGAGAAA
	Beta-espect2 (Reg 2)	Betasp2-R2_T7	39	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGGGCAGCTTCTTGTTTCCTC
Par 12	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-F1_T7	40	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTGAAATGTTAGCAAATATAACATCC
	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-R1	41	ACCTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG
Pair 13	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-F1	42	AGTGAAATGTTAGCAAATATAACATCC

	Gen (Región)	Id. del Cebador	SEQ ID NO:	Secuencia
	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-R1_T7	43	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAACCTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG
Par 14	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-F2_T7	44	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAGTCAAGATTTGAAGTGAGAGGT
	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-R2	45	CTACAAATAAAACAAGAAGGACCCC
Par 15	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-F2	46	CAAAGTCAAGATTTGAAGTGAGAGGT
	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-R2_T7	47	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/cm²)	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 espectrina2 Reg 1	1000	0.340	12	-0.014
Beta espectrina2 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 comprenden horquilla de ARNds insecticida

Transformación mediada por *Agrobacterium*

Las células, tejidos y plantas de maíz transgénicos que producen una o más moléculas de ARNds insecticidas (por ejemplo, al menos una molécula de ARNds que incluye una molécula de ARNds que apunta a un gen que comprende *rop*; 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 crisomela de maíz recién nacido por bioensayos, esencialmente como se describe en el Ejemplo 4.

Iniciación de cultivo de *Agrobacterium*. Las concentraciones de glicerol de células de cepa de *Agrobacterium* DAt13192 (WO 2012/016222A2) que albergan un vector de transformación binario pDAB114515, pDAB115770, pDAB110853 o pDAB110556 descrito anteriormente (Ejemplo 3) se extendieron 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. Luego se extendieron los cultivos en placas de YEP (gm/L: Extracto de levadura, 10; Peptona, 10; NaCl 5) que contenían los mismos antibióticos y se incubaron a 20 °C durante 1 día.

Cultivo de *Agrobacterium*. En el día de un experimento, se preparó una solución de concentrado de medio de inoculación y acetosiringona en un volumen adecuado a la cantidad de construcciones en el experimento y pipetea en un

matraz de 250 mL estéril, desechable. Inoculation Medium (Frame et al. (2011) *Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos.* En: Plant Embryo Culture Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. T. A. Thorpe y E. C. Yeung, (Eds.), Springer Science and Business Media, LLC. PP 327-341) contiene: gm 2,2/L MS sales; 1 X ISU vitaminas MS modificadas (marco et al., ibid.) 68,4 gm/L de sacarosa; 36 gm/L de glucosa; 115 mg/L de L-prolina; y 100 mg/L de myo-inositol ; a un pH de 5,4). Se agregó acetosiringona al matraz que contiene medio de inoculación a una concentración final de 200 µM de una solución de concentrado de 1 M en 100% dimetil sulfóxido y luego se mezcló bien la solución.

Para cada construcción, 1 o 2 se suspendieron 1 o dos asas bacteriológicas llenas de *Agrobacterium* de la placa de YEP en 15 mL de la solución madre de medio de inoculación /acetosiringona en un tubo de centrífugación de 50 mL estéril y desechable, y se midió la densidad óptica de la solución a 550 nm (OD_{550}) en un espectrofotómetro. Luego se diluyó la suspensión a OD_{550} de 0,3 a 0,4 mediante una mezcla adicional de medio de inoculación /acetosiringona. El tubo de la suspensión *Agrobacterium* fue entonces colocado horizontalmente en un agitador de plataforma en aproximadamente 75 rpm a temperatura ambiente y sacudido por 1 a 4 horas mientras se realizaba la disección del embrión.

Esterilización de espigas y aislamiento del

embrión. Los embriones inmaduros de maíz se obtuvieron de plantas de la línea consanguínea de *Zea mays* B104 (Hallauer y cols. (1997) Crop Science 37:1405-1406) cultivadas en invernadero y autopolinizadas o polinizadas por medios hermanos para producir las espigas. Las espigas se cosecharon aproximadamente 10 a 12 días después de la polinización. En la jornada experimental, se esterilizaron superficialmente las espigas peladas por inmersión en una solución al 20% de blanqueador comercial (ULTRA CLOROX® blanueador germicida, 6,15% de 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 disecados asépticamente de cada espiga y distribuidos al azar en los tubos de microcentrífugación con 2,0 mL de una suspensión de células adecuadas de *Agrobacterium* en medio líquido de inoculación con 200 µM de acetosiringona, al cual se había agregado 2 µL de 10% de surfactante BREAK THRU® S233 (EVONIK INDUSTRIES; Essen, Alemania). Para un determinado conjunto de experimentos, se usaron los embriones de las espigas reunidas para cada transformación.

Co-Cultivo de Agrobacterium. Después del aislamiento, los embriones fueron colocados en una plataforma oscilante durante 5 minutos. Luego se virtió el contenido del tubo sobre una placa de medio de co-cultivo que contenía 4,33 gm/L de sales MS; vitaminas MS modificadas; 1 X ISU 30 gm/L

de sacarosa; 700 mg/L de L-prolina; 3,3 mg/L de Dicamba en KOH (ácido 3,6-dicloro-o-anísico o ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico); 100 mg/L de myo-inositol; 100 mg/L de hidrolizado enzimático de caseína ; 15 mg/L de $AgNO_3$; 200 µM de acetosiringona en DMSO; y 3 gm/L GELZAN™ a un pH de 5,8. La suspensión líquida de Agrobacterium fue retirada con una pipeta estéril, desechable. Los embriones fueron entonces orientados 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 $m^{-2}s^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa (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; $AgNO_3$ 15 mg/L; gm 0,5/L MES (2 (N Morfolino) etanesulfónico monohidrato; PHYTOTECHNOLOGIES L.; Lenexa, KS); Carbenicilina 250 mg/L; y 2,3 gm/L GELZAN ™; 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 $m^{-2}s^{-1}$ PAR de 7 a 10 días.Luego, los

embriones callosos fueron transferidos (< 18/placa) a un Medio de Selección I, el cual estaba compuesto por Medio de Reposo (arriba) con ácido de R-Haloxifop de 100 nM (0,0362 mg/L; para selección de callos que albergan el gen AAD-1). Las placas se devolvieron a cajas transparentes y se incubaron a 27 °C con luz continua en aproximadamente 50 µmol $m^{-2}s^{-1}$ PAR por 7 días. Luego, los embriones callosos fueron transferidos (< 12/placa) a un Medio de Selección II, que se compone de Medio de Reposo (arriba) con ácido de R-Haloxifop de 500 nM (0,181 mg/L). Las placas se devolvieron a cajas transparentes y se incubaron a 27 °C con luz continua en aproximadamente 50 µmol $m^{-2}s^{-1}$ PAR por 14 días. Este paso de selección le permite al callo transgénico proliferar y diferenciarse.

Los callos embriogénicos proliferantes fueron transferidos (<9/placa) a un Medio de Pre-regeneración. El Medio de Pre-regeneración contenía sales MS de 4,33 gm/L ; vitaminas MS modificadas de 1 X ISU ; 45 gm/L de sacarosa; 350 mg/L de L-prolina; 100 mg/L de myo-inositol; 50 mg/L de hidrolizado enzimático de caseína ; 1,0 mg/L de $AgNO_3$; 0,25 gm/L MES; 0,5 mg/L de ácido naftalenacético en NaOH; 2,5 mg/L de ácido abscísico en etanol; 1 mg/L de 6-bencilaminopurina; 250 mg/L de Carbenicilina; 2,5 gm/L GELZAN ™; y 0,181 mg/L de ácido Haloxifop; a un pH de 5,8. Las placas fueron guardadas en cajas transparentes y se incubaron a 27 °C con luz continua en aproximadamente 50 µmol $m^{-2}s^{-1}$ PAR por 7 días.

Luego, los callos regenerados fueron transferidos (<6/placa) a un Medio de Regeneración en PHYTATRAYS™ (SIGMA ALDRICH) y se incubaron a 28 °C con 16 horas de luz/8 horas de oscuridad (a aproximadamente 160 µmol $m^{-2}s^{-1}$ PAR) durante 14 días o hasta que se desarrollen brotes y raíces. El medio de regeneración contenía 4,33 gm/L de sales MS; vitaminas MS modificadas 1 X ISU ; 60 gm/L de sacarosa; 100 mg/L de myo-inositol; 125 mg/L de carbenicilina; 3 gm/L de goma GELLAN™; y 0,181 mg/L R de ácido haloxifop; a un pH de 5,8. Los pequeños brotes con raíces primarias fueron aislados y transferidos al Medio de Alargamiento sin selección. El Medio de Alargamiento contenía 4,33 gm/L de sales MS; vitaminas MS modificadas 1 X ISU; 30 gm/L de sacarosa; y 3,5 gm/L de GELRITE®: a un pH de 5,8.

Los brotes de la planta transformada seleccionados por su capacidad de crecer en un medio que contiene Haloxifop fueron trasplantados de PHYTATRAYS™ a macetas pequeñas llenas de medio de cultivo (PROMIX BX; PREMIER TECH HORTICULTURE), cubiertas con tazas o HUMI-DOMOS (ARCO PLASTICS) y luego endurecidos apagado en una cámara de cultivo CONVIRON (27 °C día/24 °C noche, fotoperíodo de 16 horas, 50-70% RH, 200 µmol $m^{-2}s^{-1}$ 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, los ensayos qPCR de ARN fueron utilizados para detectar la presencia de la secuencia del intrón ST-LS1 en ARNds expresados de transformantes putativos. Las plántulas transformadas seleccionadas fueron trasladadas a un invernadero para su cultivo y pruebas.

Transferencia y establecimiento de plantas T_0 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 (PROFILE/METRO MIX 160) y cultivadas hasta que florecieron en el invernadero (tipo de exposición de luz: foto o asimilación; Alto límite de luz: 1200 PAR; duración del día de 16 horas; 27 °C día / 24 °C la noche).

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

Se obtuvieron plantas de la generación de T_1 mediante la polinización de sedas de plantas transgénicas T_0 con polen recogido de plantas de la línea consanguínea élite no transgénica B104 u otros donantes adecuados de polen y plantando las semillas resultantes. Se realizaron cruces recíprocos cuando fue posible.

Ejemplo 7

Análisis moleculares de los tejidos de maíz transgénicos

Se realizaron análisis moleculares (ej.: ARN qPCR) de tejidos de maíz sobre muestras de hojas y raíces que se recolectaron de plantas cultivada en invernadero los mismos días en los que se evaluó la raíz de daños de la alimentación.

Los resultados de ensayos de ARN qPCR para el Per5 3'UTR se utilizaron para validar la expresión de los transgenes de horquilla. (Se espera un bajo nivel de detección de Per5 3' UTR en las plantas de maíz no transformadas, puesto que generalmente no hay expresión del gen Per5 endógeno en tejidos de maíz). Los resultados de ensayos de ARN qPCR para la secuencia de intrón de ST-LS1 (que es parte integral de la formación de moléculas de horquilla de ARNds) en RNAs expresados se 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.

Los análisis de qPCR de ADN para detectar una porción de la región codificante de AAD1 en el ADN genómico 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 qPCR de ADN 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 a estudios posteriores en el invernadero.

Además, los ensayos de qPCR diseñados para detectar una porción del gen de resistencia a la espectinomicina (SpecR; albergada en los plásmidos de vector binario fuerad el ADN-T) fueron utilizados para determinar si las plantas transgénicas contenían secuencias de plásmido de cadena principal integradas extrañas.

Nivel de expresión de transcripción hairpin ARN: por 5 3' UTR qPCR. Eventos de la célula del callo o las plantas transgénicas se analizaron por secuencia de tiempo real PCR cuantitativa (qPCR) del Por 5 3' UTR para 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: 48; GENBANK® No. de adhesión BT069734) que codifica un TIP41 como proteína (es decir un homólogo del maíz de GENBANK® No. de adhesión AT4G34270; con una puntuación de tBLASTX de identidad del 74%). El ARN fue aislado usando un equipo de 96 RNAEASY ™ (QIAGEN, Valencia, CA). Luego de la elución, el ARN total fue sometido a un tratamiento de DNAse1 según el protocolo sugerido del equipo. Luego se cuantificó el ARN en un espectrofotómetro NANODROP® 8000 (THERMO SCIENTIFIC) y la concentración fue normalizada a 25 ng/µL. La primera hebra ADNc se preparó utilizando un equipo de síntesis ADNc de alta

capacidad (INVITROGEN) en un volumen de reacción de 10 µL con 5 µL de ARN desnaturalizado, sustancialmente según el protocolo recomendado del fabricante. El protocolo se modificó ligeramente para incluir la adición de 10µL de 100 µM T20VN oligonucleotido (IDT) (SEQ ID. NO:49; TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN, 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 aleatoria, con el fin de preparar una cepa de trabajo de cebadores aleatorios combinados y oligo dT.

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

Se realizaron ensayos en tiempo real PCR por separado para la transcripción Per5 3' UTR y TIP41 similar en un LIGHTCYCLER™ 480 (ROCHE DIAGNOSTICS, Indianapolis, IN) en volúmenes de reacción de 10 µL. Para el ensayo Per5 3' UTR, las reacciones fueron realizadas con cebadores P5U76S (F) (SEQ ID. NO: 50) y P5U76A (R) (SEQ ID. NO: 51) y una SONDA UNIVERSAL ROCHE ™ (UPL76; Catálogo no. 4889960001; etiquetado con FAM). Para el ensayo de referencia genética similar a TIP41, se usaron cebadores TIPmxF (SEQ ID. NO: 52) y TIPmxR (SEQ ID. NO: 53) y la Sonda HXTIP (SEQ ID. NO: 54) marcados con HEX (hexaclorofluoresceina).

Todos los ensayos incluyeron controles negativos de ninguna plantilla (solo mezcla). Para las curvas estándar, un espacio en blanco (agua del pozo de fuente) también fue

incluido en la placa de la fuente para verificar la contaminación cruzada de la muestra. Las secuencias de cebador y de sonda se presentan en la Tabla 6. Las recetas de los componentes de reacción para la detección de las diversas transcripciones se exponen en la Tabla 7 y las condiciones de las reacciones de PCR se resumen en la Tabla 8. La mitad fluorescente de FAM (6 carboxi fluoresceína Amidite) se excitó a 465 nm y la fluorescencia se midió a 510 nm; los valores correspondientes para la mitad fluorescente HEX (hexaclorofluoresceína) fueron 533 nm y 580 nm.

Tabla 6. Secuencias de cebador 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)	50	ttgtgatgttggtggcgtat
Per5 3'UTR	P5U76A (R)	51	tgttaaataaaaccccaaagatcg
Per5 3'UTR	Roche UPL76 (Sonda -FAM-)	NAv**	Número del catálogo de diagnósticos de Roche 488996001
TIP41	TIPmxF	52	TGAGGGTAATGCCAACTGGTT
TIP41	TIPmxR	53	GCAATGTAACCGAGTGTCTCTCAA
TIP41	HXTIP (sonda -HEX)	54	TTTTTGGCTTAGAGTTGATGGTGTACTGATGA

*TIP41-parecida 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	1X	1X
P5U76S (F)	0.4 µM	0
P5U76A (R)	0.4 µM	0
Roche UPL76 (FAM)	0.2 µM	0
HEXtipZM F	0	0.4 µM
HEXtipZM R	0	0.4 µM
HEXtipZMP (HEX)	0	0.2 µM
cDNA (2.0 µL)	NA	NA
Agua	To 10 µL	To 10 µL

Tabla 8. Condiciones del termociclador para qPCR.

TIP41-similar al Gen y Per5 3'UTR Detección			
Proceso	**Temp**	**Tiempo**	**No. de Ciclos**
Activación 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 Software ™ LIGHTCYCLER v1.5 por cuantificación relativa utilizando un

segundo algoritmo máximo derivado para el cálculo de los valores de Cq según las recomendaciones del proveedor. Para los análisis de expresión, los valores de expresión fueron calculados usando el método ΔΔCt (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 2 siendo seleccionado bajo la suposición de que, para las reacciones de PCR optimizadas, el producto duplica cada ciclo.

Tamaño e integridad de la transcripción de horquilla: 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 rop ARN en plantas transgénicas que expresan una horquilla rop 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 tubos SAFELOCK EPPENDORF de 2 mL, se interrumpen 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 incuban a temperatura ambiente (RT, por sus siglas en inglés) durante 10 minutos. Opcionalmente, las muestras se centrifugan durante 10 min a 4 °C a 11.000 rpm y el sobrenadante se transfiere a un tubo SAFELOCK EPPENDORF fresco de 2 mL. Después de añadir 200 µL de cloroformo al

homogeneizado, el tubo es mezclado por inversión de 2 a 5 minutos, se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifuga a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. La fase superior se transfiere a un tubo EPPENDORF estéril de 1,5 mL, se agregan 600 µL de isopropanol al 100%, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 10 min a 2 h, luego se centrifuga a 12.000 x g durante 10 min a temperatura de 4 °C a 25 °C. Se descarta el sobrenadante y el comprimido de ARN se lava dos veces con 1 mL de etanol al 70%, con centrifugación a 7.500 x g durante 10 min a temperatura de 4 °C a 25 °C entre lavados. El etanol es descartado y el comprimido es brevemente secado al aire durante 3 a 5 min antes de resuspender en 50 µL de agua libre de nucleasas.

El ARN total se cuantifica mediante el NANODROP® 8000 (THERMO FISHER) y las muestras se normalizan a 5 µg/10 µL. 10 µL de glioxal (AMBION/INVITROGEN) se añaden a cada muestra. Cinco a 14 ng de mezcla de marcador estándar DIG ARN (ROCHE APPLIED SCIENCE, Indianapolis, IN) son proporcionados y agregados a un volumen igual de glioxal. Las muestras y los marcadores RNA se desnaturalizan a 50 °C por 45 min y se almacenan en hielo hasta el cargamento en un 1,25% de gel de agarosa SEAKEM GOLD (LONZA, Allendale, NJ) en un tampón de ejecución glioxal NORTHERNMAX 10 X (AMBION/INVITROGEN). RNAs son separados por electrofóresis a 65 voltios/30 mA durante 2 horas y 15 minutos.

Después de la electrofóresis, 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 es pasivamente transferido a una membrana de nailon (MILLIPORE) durante la noche a temperatura ambiente, 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 aclara en 2 X SSC durante 5 minutos, el ARN es reticulado por UV a la membrana (AGILENT/STRATAGENE) y la membrana se deja secar a temperatura ambiente durante máximo 2 días.

La membrana es prehibridada en el tampón ULTRAHYB (AMBION/INVITROGEN) durante 1 a 2 h. La sonda consta de un producto amplificado de PCR que contiene la secuencia de interés (por ejemplo, la parte de la secuencia antisentido del ID de SEC NO: 13 o SEQ ID. NO: 14, según corresponda) marcado con digoxigenina mediante un procedimiento DIG de ROCHE APPLIED SCIENCE. La hibridación en el tampón recomendado es durante la noche a una temperatura de 60°C en tubos de hibridación. Después de la hibridación, la mancha es sometida a lavados DIG, envuelta, expuesta a la película durante 1 a 30 minutos, luego la película se desarrolla, todo por métodos recomendados por el proveedor del equipo DIG.

Determinación del número de copia de transgenes

Los pedazos de hojas de maíz aproximadamente equivalentes a 2 golpes de hoja se recolectaron en placas de colección de 96 pocillos (QIAGEN). Se realizó una

interrupción del tejido con un pulverizador de tejido KLECKO™ (fabricación de GARCIA, Visalia, CA) en el tampón de lisis BIOSPRINT96 AP1 (suministrado con un equipo de planta BIOSPRINT96; QIAGEN) con un grano de acero inoxidable. Después de la maceración del tejido, el ADN genómico (gDNA) fue aislado en formato de alto rendimiento utilizando un equipo de planta BIOSPRINT96 y un robot de extracción BIOSPRINT96. La extracción de ADN genómico fue diluida 2:3 ADN:agua antes de configurar la reacción qPCR.

Análisis de qPCR. La detección de transgenes por ensayo de sonda de hidrólisis se realizó por PCR en tiempo real usando un sistema LIGHTCYCLER® 480. Los oligonucleótidos a ser usados en los ensayos de sonda de hidrólisis para detectar la secuencia del intrón de ST LS1 (SEQ ID NO: 16), 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: 55; oligonucleótidos SPC1 en la Tabla 9), fueron diseñados usando ®el software de diseño de sonda LIGHTCYCLER® 2.0. Además, los oligonucleótidos a ser usados en los ensayos de sonda de hidrólisis para detectar un segmento del gen de tolerancia herbicida 1 AAD (SEQ ID NO: 56; los oligonucleótidos GAAD1 en la Tabla 9) fueron diseñados usando el software PRIMER EXPRESS (APPLIED BIOSYSTEMS). La Tabla 9 muestra las secuencias de los cebadores y las sondas. Los ensayos fueron multiplexados con reactivos para un gen cromosómico de maíz endógeno (invertasa

(SEQ ID. NO: 57; No. de adhesión GENBANK®: U16123; de aquí en adelante IVR1) que sirvió como una secuencia de referencia interna para asegurar que el gDNA estuviese presente en cada ensayo. Para la amplificación, la mezcla de LIGHTCYCLER® 480 PROBES MASTER (ROCHE APPLIED SCIENCE) fue preparado en la concentración final de 1 X en una reacción múltiplex en un volumen de 10 µL que contiene 0.4 µM de cada cebador y 0.2 µM de cada sonda (Tabla 10). Una reacción de amplificación de dos etapas fue realizada como se indica en la Tabla 11. La activación y emisión del fluoróforo de las sondas etiquetadas FAM y HEX fueron como se describen anteriormente; los conjugados CY5 se excitan a máximo 650 nm y fluorescen a máximo 670 nm.

Los puntajes de CP (el punto en el cual la señal de fluorescencia cruza el umbral de fondo) se determinaron a partir de los datos PCR de tiempo real utilizando el algoritmo de puntos fijos (versión 1.5 del LIGHTCYCLER® SOFTWARE) y el módulo de Quant relativa (basado en el método de Ct). Los datos fueron tratados como se describe anteriormente (anteriormente; ARN qPCR).

Tabla 9. Secuencias de cebadores y sondas (con conjugado fluorescente) utilizadas para las determinaciones del número de copia del gen y detección de la columna vertebral del plásmido de vector binario.

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
GAAD1-F	61	TGTTCGGTTCCCTCTACCAA
GAAD1-R	62	CAACATCCATCACCTTGACTGA
GAAD1-P (FAM)	63	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA
IVR1-F	64	TGGCGGACGACGACTTGT
IVR1-R	65	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT
IVR1-P (HEX)	66	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC
SPC1A	67	CTTAGCTGGATAACGCCAC
SPC1S	68	GACCGTAAGGCTTGATGAA
TQSPEC (CY5*)	69	CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA

CY5 = Cianina-5

Tabla 10. Componentes de la reacción para análisis del número de copia del gen y detección de la columna vertebral del plásmido.

Componente	Amt. (µL)	Densidad	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_2O	0.6	NA*	NA
gDNA	2.0	ND**	ND
Total	10.0		

Tabla 11. Condiciones del termociclador para ADN qPCR

Análisis del número de copia Genómica			
Proceso	**Temp.**	**Tiempo**	**No. de Ciclos**
Activación 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 8

Bioensayo de maíz transgénico

Bioensayos de insectos *in vitro* La bioactividad de ARNds de la invención de materia producida en las células vegetales es demostrada por métodos de bioensayo. Véase, por ejemplo, Baum et al. (2007) NAT Biotechnol. 25 (11) : 1322-1326, (1326)). Uno es capaz de demostrar eficacia, por ejemplo, por la alimentación de diversos tejidos vegetales o piezas de tejido derivados de una planta que produce un ARNds insecticida cuyo objetivo son insectos en un entorno controlado de alimentación. Alternativamente, se prepararon extractos de diversos tejidos de planta derivados de una

planta que produce el ARNds insecticida y los ácidos nucléicos extraídos son dispensados en la cima de dietas artificiales para bioensayos según se describió anteriormente en este documento. Se comparan los resultados de dichos ensayos de alimentación a bioensayos realizados de manera similar que emplean tejidos de control adecuado de plantas hospederas que no producen un ARNds insecticida, o a otras muestras de control.

Bioensayos de Insectos con eventos transgénicos de maíz

Dos larvas de crisomela del maíz (1 a 3 días de nacidas) extraídas de huevos lavados son seleccionadas y colocadas en cada pocillo de la bandeja de bioensayo. Los pocillos son entonces cubiertos con una cobertura "PULL N' PEEL" (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, se evalúa la mortalidad de las larvas que se calcula como el porcentaje de insectos muertos en el número total de insectos en cada tratamiento. Las muestras de insectos se congelan a -20 °C durante dos días, luego las larvas de los insectos de cada tratamiento son agrupadas y pesadas. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calcula como el peso medio de los tratamientos experimentales divididos por la media del peso promedio de dos tratamientos de pocillo de control. Los datos se expresan como el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (de los

Controles Negativos). Los pesos medios que exceden el peso medio de control se normalizan a cero.

Bioensayos de insectos en el invernadero. Los huevos de crisomela del maíz (WCR, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) fueron recibidos en el suelo de CROP CHARACTERISTICS (Farmington, MN). Los huevos WCR se incubaron a 28 °C durante 10 a 11 días. Los huevos fueron lavados de la tierra, puestos en una solución de agar 0,15% y la concentración se ajustó a aproximadamente 75 a 100 huevos por 0,25 mL de alícuota. Se colocó una placa incubadora en una placa de Petri con una alícuota de suspensión de huevo para monitorear tasas de incubación.

El suelo alrededor de las plantas de maíz que crece en ROOTRAINERS® estaba infestado con 150 a 200 huevos WCR. Se permitió que los insectos se alimentaran por 2 semanas, tras lo cual se otorgó un "puntaje de raíz" a cada planta. Una Escala de Lesión de Nodo fue utilizada para calificar esencialmente según Oleson et al. (2005) *J. Mol.* Entomol. 98:1 8. Las plantas que aprobaron 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 ocasionados por crisomelas y por la liberación de insectos en los invernaderos. Las plantas fueron polinizadas manualmente para la producción de semilla. Las semillas producidas por estas plantas fueron reservadas para la evaluación en el T_1 y las generaciones subsiguientes

de las plantas.

Los bioensayos de invernadero incluyeron dos tipos de plantas de control negativo. Las plantas transgénicas control negativo fueron generadas por transformación con vectores albergando genes diseñados para producir una proteína fluorescente amarilla (YFP) o una horquilla YFP ARNds (ver Ejemplo 4). Plantas de control negativo no transformadas fueron cultivadas de semillas de líneas 7sh382 o B104. Los bioensayos se llevaron a cabo en dos fechas separadas, con controles negativos incluidos en cada conjunto de materiales vegetales.

La Tabla 12 muestra los resultados combinados de los análisis moleculares y bioensayos para plantas de horquilla rop. El examen de los resultados del bioensayo resumidos en la Tabla 12 revela la sorprendente e inesperada observación que la mayoría de las plantas de maíz transgénicas que albergan construcciones que expresan una horquilla rop ARNds que contiene segmentos de SEQ ID. NO: 1, por ejemplo, como se ejemplifica en el SEQ ID. NO: 13 y SEQ ID. NO: 14, están protegidas contra daños de raíz ocasionados por la alimentación de las larvas de crisomela del maíz. Veintidós de los 37 eventos graduados tenían una clasificación de raíz de 0.5 o menos. La Tabla 13 muestra los resultados combinados de los análisis moleculares y bioensayos para las plantas de control negativo. La mayoría de las plantas no tenían ninguna protección contra la

alimentación de las larvas WCR, aunque cinco de las 34 plantas clasificadas tenían una clasificación de raíz de 0.75 o menos. La presencia de algunas plantas con baja puntuación de calificación de raíz entre la planta de control negativo establecida se observa a veces y refleja la variabilidad y la dificultad de llevar a cabo este tipo de bioensayo en un entorno de invernadero.

Tabla 12. Bioensayo de invernadero y resultados de análisis moleculares de plantas de maíz expresando horquilla rop.

Id. de la Muestra	Tejido de la hoja		Tejido de la raíz		
	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	Clasificación de raíz
Eventos *rop* v1 Horquilla					
114515[1]-001.001	0.162	62.7	0.026	89.9	0.05
114515[1]-005.001	0.170	131.6	0.082	30.1	0.05
114515[1]-008.001	0.268	194.0	0.068	113.8	0.75
114515[1]-009.001	0.262	121.1	0.146	52.0	0.75
114515[1]-010.001	1.028	56.5	0.110	8.7	1
114515[1]-012.001	0.133	103.3	0.051	28.1	0.5
114515[1]-013.001	0.145	63.6	0.059	168.9	1
114515[1]-014.001	0.203	172.4	0.072	104.0	0.25
114515[1]-015.001	0.257	127.1	0.021	89.3	0.25
114515[1]-016.001	0.363	235.6	0.129	213.8	0.1
114515[1]-017.001	0.225	128.9	0.037	115.4	0.25
114515[1]-018.001	0.110	81.0	0.093	200.9	0.5
114515[1]-019.001	0.122	87.4	0.013	85.0	0.1
114515[1]-020.001	0.221	65.3	0.142	27.3	1
114515[1]-022.001	0.486	91.8	0.063	36.8	0.25
114515[1]-023.001	0.257	117.8	0.043	117.0	1

Id. de la Muestra	Tejido de la hoja		Tejido de la raíz		
	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	Clasificación de raíz
114515[1]-028.001	0.204	68.6	0.076	163.1	1
Eventos rop v3 Hairpin					
115770[1]-001.001	0.227	242.2	0.113	404.5	0.01
115770[1]-002.001	0.163	128.0	0.283	404.5	0.05
115770[1]-004.001	0.174	90.5	0.222	148.1	0.05
115770[1]-005.001	0.159	143.0	0.166	96.3	0.05
115770[1]-007.001	0.072	88.0	0.274	238.9	0.01
115770[1]-008.001	0.101	117.8	0.068	68.6	0.1
115770[1]-012.001	0.920	298.2	0.146	199.5	0.5
115770[1]-014.001	2.497	467.9	5.134	424.6	0.75
115770[1]-015.001	1.310	266.9	0.179	226.0	0.75
115770[1]-018.001	0.871	245.6	0.222	238.9	0.75
115770[1]-019.001	0.959	243.9	0.366	296.1	0.5
115770[1]-020.001	0.889	252.5	0.398	369.6	0.75
115770[1]-022.001	0.824	296.1	0.176	498.0	0.1
115770[1]-024.001	0.707	333.1	0.145	261.4	0.25
115770[1]-027.001	0.566	337.8	0.312	487.8	0.75
115770[1]-028.001	0.366	166.6	0.080	121.1	0.75
115770[1]-029.001	1.125	252.5	0.268	315.2	0.5

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

Tabla 13. Bioensayo de invernadero y resultados de los análisis moleculares de las plantas de control negativo que comprenden las plantas de maíz transgénicas y no transformadas.

Id. de la muestra	Tejido de la hija		Tejido de la raíz		
Eventos de proteína YFP	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	Clasificación de la raíz
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 la horquilla YFP					
110853[8]-289.001	0.117	97.0	0.122	65.3	0.5

Id. de la muestra	Tejido de la hija		Tejido de la raíz		
Eventos de proteína YFP	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	Clasificación de la raíz
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
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

Id. de la muestra	Tejido de la hija		Tejido de la raíz		
Eventos de proteína YFP	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	Clasificación de la raíz
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

Zea mays transgénico que comprende secuencias de plagas de coleóptero

De diez a 20 plantas transgénicas T_0 Zea mays se generan como se describe en el Ejemplo 6. Otras líneas independientes 10 20 T_1 de *Zea mays* que expresan horquillas ARNds para una construcción ARNi se obtienen para el desafío de las crisomelas del maíz. La horquilla ARNds se puede

derivar como se expone en la SEQ ID. NO: 13, SEQ ID. NO: 14, o de otro modo que comprende además la SEQ ID. NO: 1. Horquillas ARNds adicionales pueden derivarse, por ejemplo, de las secuencias de plagas de coleópteros como, por ejemplo, Caf1 180 (solicitud de publicación de patente estadounidense N° 2012/0174258), VatpaseC (solicitud de publicación de patente estadounidense N° 2012/0174259), Rho1 (solicitud de publicación de patente estadounidense N° 2012/0174260), VatpaseH (solicitud de publicación de patente estadounidense N° 2012/0198586), PPI 87B (solicitud de publicación de patente estadounidense N° 2013/0091600), RPA70 (solicitud de publicación de patente estadounidense N° 2013/0091601), o RPS6 (solicitud de publicación de patente estadounidense N° 2013/0097730). Estos son confirmados a través de RT PCR u otros métodos de análisis molecular. Las preparaciones de ARN total de líneas T_1 independientes seleccionadas se utilizan opcionalmente para la RT PCR con cebadores diseñados para unirse en el intrón ST LS1 de la casete de expresión de la horquilla en cada una de las construcciones de ARNi. Además, los cebadores específicos para cada gen objetivo en un constructo ARNi se utilizan opcionalmente para amplificar y confirmar que la producción del ARNm pre-procesado necesario para la producción de ARNsi *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión de la horquilla del ARN en cada planta transgénica *Zea mays*. El procesamiento de la horquilla de ARNds de los

genes objetivo en ARNsi se confirma posteriormente opcionalmente en líneas transgénicas independientes mediante hibridaciones de la mancha de ARN.

Además, las moléculas de ARNi con secuencias de desajuste con más de 80% de identidad de secuencia a genes objetivo afectan las crisomelas de maíz en una forma similar a la observada con las moléculas de ARNi, teniendo una identidad de secuencia de 100% a los genes objetivo. El emparejamiento de secuencia de desajuste con secuencias nativas para formar una horquilla ARNds en la misma construcción ARNi entrega siRNAs procesadas en planta capaces de afectar el crecimiento, desarrollo y viabilidad de alimentación de las plagas de coleópteros.

La entrega *in planta* de ARNds, ARNsi ARNsh o ARNmi correspondiente a genes objetivo y la posterior absorción por plagas de coleópteros a través de alimentación resulta en baja regulación de los genes objetivo en la plaga de coleópteros a través del silenciamiento génico mediado por ARN. Cuando la función de un gen objetivo es importante en una o más etapas de desarrollo, el crecimiento, desarrollo y reproducción de la plaga de coleópteros son afectados y en el caso de al menos uno de WCR, NCR, SCR, MCR, D. balteata LeConte, u. D. tenella y u. D. undecimpunctata Mannerheim, conducen a errores para infestar, alimentar, desarrollar y/o reproducir de manera exitosa, o conduce a la muerte de la plaga de coleópteros. La elección de genes objetivo y la

exitosa aplicación de ARNi se utiliza entonces para controlar las plagas de coleópteros.

Comparación fenotípica de líneas ARNi transgénicas y *Zea mays* no transformados. Los genes de plagas de coleópteros objetivo o las secuencias seleccionadas para la creación de horquilla ARNds no tienen ninguna semejanza a cualquier secuencia conocida de genes de planta. Por lo tanto, no se espera que la producción o la activación de ARNi (sistémica) por construcciones dirigidas a estos genes de plagas de coleópteros o secuencias tenga algún efecto deletéreo sobre las plantas transgénicas. Sin embargo, el desarrollo y las características morfológicas de las líneas transgénicas se comparan con las plantas no transformadas, así como aquellos de líneas transgénicas transformadas con un vector "vacío" sin tener ningún gen que exprese horquilla. Las características de la raíz, la copa, el follaje y la reproducción son comparadas. No hay diferencias observables en los patrones de crecimiento y longitud de la raíz de plantas transgénicas y no transformadas. Las características del brote de la planta tales como la altura, el número y tamaño de las hojas, el tiempo de florecimiento, el tamaño floral y la apariencia son similares. En general, no hay diferencias morfológicas observables entre líneas transgénicas y aquellas sin expresión de moléculas de ARNi objetivo cuando se cultivan *in vitro* y en tierra en el invernadero.

Ejemplo 10

Transgénico *Zea mays* que comprende una secuencia de plagas coleóptero y consrucciones ARNi adicionales

Una planta transgénica de *Zea mays* que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe en una molécula de ARNi que apunta a un organismo diferente a una plaga de coleópteros se transforma de manera secundaria mediante metodologías *Agrobacterium* o WHISKERS™ (véase Petolino y Arnold (2009) métodos de Mol. Biol. 526:59 67) para producir una o más moléculas de ARNds insecticidas (por ejemplo, al menos una molécula de ARNds incluyendo una molécula de ARNds apuntando a un gen que comprende la SEQ ID. NO: 1). Los vectores de plásmido de transformación de planta preparados esencialmente como se describe en el Ejemplo 3 se entregan a través de métodos de transformación mediados por *Agrobacterium* o WHISKERS ™ a células de suspensión de maíz o embriones inmaduros de maíz obtenidos de un Hi II transgénico o de una planta Zea mays B104 que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe en una molécula de ARNi apuntando a un organismo diferente a una plaga de coleópteros.

Ejemplo 11

Zea mays transgénicos que comprenden una construcción ARNi y secuencias de control de plagas de coleóptero adicionales

Una planta transgénica de Zea mays que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe en una molécula de ARNi que apunta a 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) se transforma de manera secundaria mediante las metodologías *Agrobacterium* o WHISKERS ™ (véase Petolino y Arnold (2009) Methods Mol. Biol. 526:59 67) para producir una o más moléculas de proteína insecticida, por ejemplo, Cry3 o Cry34 y Cry35Ab1. Los vectores de plásmido de transformación de una planta preparados esencialmente como se describe en el Ejemplo 3 se entregan a través de métods de transformación mediados por *Agrobacterium* o WHISKERS ™ a células de suspensión de maíz o embriones inmaduros de maíz obtenidos de una planta de Zea mays transgénica B104 compuesta por una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe en una molécula de ARNi que apunta a un organismo de plagas de coleópteros. Se producen plantas doblemente transformadas que producen moléculas de ARNi y proteínas insecticidas para el control de plagas de coleópteros.

Ejemplo 12

Otras secuencias de Diabrótica con homología a ROP

La proteína ROP (SEQ ID. NO: 2) contiene un dominio conservado de la familia Sec1 (pfam00995). Las proteínas de

la familia Sec1 son conocidas por estar involucradas en la transmisión sináptica y la secreción general. Se usó hmmscan para la predicción del dominio PFAM en las secuencias de transcriptoma WCR. Los análisis de homología de proteína utilizando un dominio Sec1 identificaron otras 42 secuencias *Diabrotica virgifera* (ID de Sec. NOs: 70 a 111) que codifican las proteínas que contienen un dominio Sec1 y en consecuencia pueden compartir propiedades estructurales y/o funcionales con la proteína de ROP. Así, los genes (es decir, SEQ ID. NOs: 70 111) que codifican estas proteínas son candidatos adicionales para el control mediado por ARNi de las especies *Diabrotica*, incluyendo al menos un WCR, NCR, SCR, MCR, aparece D. *balteata* LeConte, *u. D. tenella* y *u. D. undecimpunctata* Mannerheim, por los métodos descritos en este documento.

Ejemplo 13

La mortalidad del chinche marrón neotropical (*Euschistus heros*) después de la inyección de ARNi rop

Cría del Insecto. Los chinches marrón neotropicales (BSB; *Euschistus heros*) fueron criados con una dieta artificial BSB preparada como se explica a continuación (usada dentro de las dos semanas siguientes a la preparación). Los ejotes liofilizados se mezclaron con un polvo fino en una licuadora MAGIC BULLET® mientras que los cacahuetes crudos (orgánicos) se mezclaron en otra licuadora

MAGIC BULLET® por separado. Se combinaron los ingredientes secos mezclados (porcentajes de peso: ejotes, 35%; cacahuetes, 35%; sacarosa, 5%; complejo vitamínico (p. Ej. mezcla de vitamina Vanderzant para los insectos, SIGMA ALDRICH, catálogo no. V1007), 0.9%); en una licuadora MAGIC BULLET® grande que fue tapada y agitada bien para mezclar los ingredientes. Luego, los ingredientes secos mezclados fueron agregados a un tazón. En un recipiente separado, se mezclaron bien agua y un agente benomilo anti hongo (50 ppm; 25 µL de una solución de dieta 20.000 ppm solución/50 mL) y luego se añadió esto a la mezcla de ingredientes secos. Todos los ingredientes se mezclaron con la mano hasta que la solución quedó completamente mezclada. La dieta fue distribuida en tamaños deseados, se envolvió holgadamente en papel de aluminio, se calentó durante 4 horas a 60 °C, y luego se dejó enfrir y se almacenó a 4 °C.

Selección del objetivo de ARNi Seis etapas de desarrollo de BSB fueron seleccionadas para la preparación de la biblioteca ARNm. El ARN total fue extraído de los insectos congelados a -70 °C y homogeneizado en 10 volúmenes de tampón de lisis/enlace en tubos de lisis MATRIX A de 2 mL (MP BIOMEDICALS, Santa Ana, CA) en un instrumento de FastPrep-24® (MP BIOMEDICALS). El ARNm total fue extraído usando un equipo de aislamiento de ARNmi mirVana ™ (AMBION; INVITROGEN) según el protocolo del fabricante. La secuenciación de ARN utilizando un sistema illumina® HiSeq ™ (San Diego, CA)

proporcionó secuencias de genes objetivo candidatas para su uso en la tecnología de control de insectos de ARNi. HiSeq ™ generó un total de aproximadamente 378 millones de lecturas para las seis muestras. Las lecturas fueron reunidas individualmente para cada muestra utilizando el software ensamblador TRINITY (Grabherr et al. (2011) Nature Biotech. 29:644 652). Las transcripciones reunidas se combinaron para generar un transcriptoma agrupado. Este transcriptoma BSB agrupado contiene 378.457 secuencias.

Identificación ortólogo BSB rop Se realizó una búsqueda tBLASTn del transcriptoma BSB agrupado utilizando como secuencia de consulta una proteína *Drosophila* ROP (ROP PA; GENBANK® no. adhesión. AAF47844.1). El BSB rop (SEQ ID. NO:115) fue identificado como un gen objetivo candidato del chinche marrón.

Preparación de la plantilla y síntesis ARNds El ADNc fue preparado del ARN total de BSB extraído de un solo insecto adulto joven (alrededor de 90 mg) usando el reactivo TRIzol® (LIFE TECHNOLOGIES). El insecto se homogeneizó a temperatura ambiente en un tubo de microcentrífuga de 1.5ML con 200 µL de TRIzol® utilizando un mortero del comprimido (FISHERBRAND catálogo N° 12 141 363) y mezclador de motor del mortero (COLE PARMER, Vernon Hills, IL). Luego de la homogeneización, se añadieron 800 µL de TRIzol® adicionales, el homogeneizado se agitó y luego se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los restos celulares fueron

removidos por centrifugación y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se añadieron 200 µL de cloroformo y se agitó la mezcla durante 15 segundos. Después de dejar la extracción en reposo a temperatura ambiente durante 2 a 3 min, las fases se separaron por centrifugación a 12.000 x g a 4 °C durante 15 minutos. La fase acuosa superior fue transferida cuidadosamente a otro tubo de microcentrífuga de 1.5ML libre de nucleasa y el ARN se precipitó con 500 µL de isopropanol a temperatura ambiente. Después de la incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó durante 10 minutos como se describe arriba. El comprimido de ARN se enjuagó con 1 mL de etanol al 75% en temperatura ambiente y se centrifugó por otros 10 minutos como se describe anteriormente. El comprimido ARN fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 200 µL de tampón Tris de GFX PCR ADN y un equipo de extracción (illustra ™; GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES) utilizando el tampón de elución tipo 4 (es decir, 10 mM Tris-HCl pH8.0). La concentración de ARN se determinó usando un espectrofotómetro NANODROP® 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE).

El ADNc fue transcrito a la inversa de 5 µg de plantilla de ARN total BSB y cebador oligo dT usando un SUPERSCRIPT III FIRST-STRAND SYNTHESIS SYSTEM™ para RT-PCR (INVITROGEN), siguiendo el protocolo recomendado del proveedor. El volumen final de la reacción de transcripción fue traído a 100 µL con agua libre de nucleasas.

Los cebadores BSB_Rop-1-For (SEQ ID. NO: 117) y BSB_Rop-1-Rev (SEQ ID. NO: 118) fueron utilizados en contacto por PCR (temperatura de hibridación disminuida de 60°C a 50 °C en un ciclo de disminución/1°C) con 1 µL de ADNc (arriba) como la plantilla. Los fragmentos que comprendían un segmento de 499 bp de rop (es decir, Región1 BSB rop; SEQ ID. NO: 119) se generaron durante 35 ciclos de PCR. Los cebadores BSB_Rop conformaban una secuencia de promotor fago T7 (SEQ ID. NO: 5) en sus extremos 5' y así permitió el uso de fragmentos de BSB rop reg1 ADN para la transcripción de ARNds.

El ARNds fue sintetizado usando 2 µL del producto de PCR (arriba) como la plantilla con un equipo ARNi de MEGAscript™ (AMBION) usado según las instrucciones del fabricante. (Ver fig. 1). El ARNds fue cuantificado en un espectrofotómetro NANODROP® 8000 y diluído en 500 ng/µL en el tampón libre de nucleasa 0,1X TE (1 mM Tris HCL, 0,1 mM EDTA, pH7.4).

Inyección de ARNds en hemocoel BSB Los BSB fueron criados con una dieta artificial (arriba) en una incubadora a 27 °C con una humedad relativa del 65% y un fotoperíodo de 16:8 horas de luz:oscuridad. Las ninfas de segundo estadio (cada una con peso de 1 a 1,5 mg) se manipularon suavemente con un cepillo pequeño para evitar lesiones y se colocaron en una placa Petri con hielo para enfriar e inmovilizar a los insectos. Cada insecto fue inyectado con 55,2 nL de una solución de ARNds de 500 ng/µL (es decir, 27,6 ARNds ng;

dosificación de 18,4 a 27,6 µg/g de peso corporal). Las inyecciones se realizaron utilizando un inyector NANOJECT™ II (DRUMMOND SCIENTIFIC, Broomhall, PA) equipado con una aguja de inyección halada de un capilar de vidrio Drummond de 8,9 cms #3-000=203-G/X. Se rompió la punta de la aguja y el tubo capilar fue rellenado con aceite mineral ligero, luego se llenó con ARNds de 2 a 3 µL. El ARNds fue inyectado en el abdomen de las ninfas (10 insectos inyectadas por ARNds por ensayo), y los ensayos se repitieron en tres días diferentes. Los insectos inyectados (5 por pocillo) fueron transferidos a bandejas de 32 pocillos (Bandeja de cría Bio RT 32; BIO SERV, Frenchtown, NJ) que contienen un comprimido de la dieta artificial BSB y que están cubiertas con lengüetas Pull-N-Peel™ (BIO CV 4; BIO SERV). La humedad fue proporcionada por medio de 1,25 mL de agua en un tubo de microcentrífuga de 1,5ML con una mecha de algodón. Las bandejas se incubaron a 26,5 °C, 60% de humedad y fotoperíodo de 16:8 luz:oscuridad. Los conteos de viabilidad y pesos fueron tomados el día 7 después de las inyecciones.

Inyecciones identificaron rop BSB como un objetivo ARNds letal El ARNds homólogo a una región de codificación YFP (preparado como en el Ejemplo 2) se utilizó como control negativo en experimentos de inyección BSB. Como se resume en la Tabla 13, 27,6 ng de ARNds BSB_rop reg1 inyectado en el hemocoel de ninfas BSB instar secundarias produjo alta mortalidad dentro de siete días. La mortalidad causada por el

ARNds BSB_rop reg1 fue significativamente diferente a la vista con la misma cantidad de ARNds YFP inyectado (control negativo).

Tabla 13. Resultados de la inyección de ARNds BSB_rop reg1 en el hemocoel de las ninfas de chinche marrón secundarias siete días después de la inyección.

Tratamiento*	Medio % Mortalidad	SEM	Pruebas N	Prueba-t (p)
BSB_*rop* reg1 ARNds	90	5.8	3	6.08E-04
YFP v2 ARNds	13	3.3	3	6.43E-01
No inyectado	10	5.8	3	

*Diez insectos inyectados por prueba para cada ARNds.

Ejemplo 14

Transgénicos Zea mays que comprenden secuencias de plaga de hemípteros

De 10 a 20 plantas transgénicas *Zea mays* T_0 que albergan vectores de expresión para los ácidos nucléicos que comprenden SEQ ID. NO: 115 o SEQ ID. NO 119 se generan como se describe en el Ejemplo 6. Otras 10-20 líneas independientes de *Zea mays* T_1 expresando horquilla ARNds para una construcción de ARNi se obtienen para el desafío BSB. La horquilla ARNds puede derivarse según se establece en SEQ ID. NO: 119 o de lo contrario comprendiendo además SEQ ID. NO: 115. Estos son confirmados a través de RT-PCR u otros métodos

de análisis molecular. Las preparaciones de ARN total de las líneas T_1 independientes seleccionadas se utilizan opcionalmente para la RT-PCR con cebadores diseñados para unirse en el intrón ST-LS1 de la casete de expresión de la horquilla en cada una de las construcciones de ARNi. Además, los cebadores específicos para cada gen objetivo en una construcción de ARNi se utilizan opcionalmente para amplificar y confirmar que la producción del ARNm pre-procesado necesario para la producción de ARNsi *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión de la horquilla del ARN en cada planta transgénica de *Zea mays*. El procesamiento de la horquilla ARNds de los genes objetivo en ARNsi se confirma posteriormente de manera opcional en líneas transgénicas independientes mediante hibridaciones de la mancha de ARN.

Además, las moléculas de ARNi que tienen secuencias de desajuste con más de 80% de identidad de secuencia a genes objetivo afectan las crisomelas en forma similar a la observada con las moléculas de ARNi con 100% de identidad de secuencia a los genes objetivo. El emparejamiento de la secuencia de desajuste con secuencias nativas para formar una horquilla ARNds en el mismo constructo ARNi produce siRNAs procesadas en planta capaces de afectar el crecimiento, desarrollo y viabilidad de la alimentación de plagas de hemípteros.

La entrega *in planta* de ARNds, ARNsi, ARNsh o ARNmi correspondientes a genes objetivo y la posterior absorción por plagas de hemípteros a través de la alimentación resulta en baja regulación de los genes objetivo en las plagas de hemípteros mediante el silenciamiento génico mediado por ARN. Cuando la función de un gen objetivo es importante en una o más etapas de desarrollo, el crecimiento, desarrollo y reproducción de la plaga de hemípteros se ve afectado, y en el caso de al menos uno de *Euchistus heros*, *Piezodorus guildinii*, *Halyomorpha halys*, *Nezara viridula*, *Acrosternum hilare* y *Euschistus servus* conduce al fracaso para infestar, alimentar, desarrollar y/o reproducir con éxito o conduce a la muerte de la plaga de hemípteros. La elección de genes objetivo y la exitosa aplicación de ARNi es entonces utilizada para controlar las plagas de hemípteros.

Comparación fenotípica de líneas ARNi transgénicas y *Zea mays* no transformadas. Los genes o secuencias de plaga de hemípteros objetivo seleccionados para la creación de horquilla ARNds no tienen ninguna semejanza a ninguna secuencia de genes de planta conocida. Por lo tanto, no se espera que la producción o la activación de ARNi (sistémica) por construcciones dirigidas a estos genes o secuencias de plaga de hemípteros tenga algún efecto deletéreo sobre las plantas transgénicas. Sin embargo, desarrollo y características morfológicas de las líneas transgénicas se comparan con las plantas no transformadas, así como las de

líneas transgénicas transformadas con un vector "vacío" sin un gen que exprese horquilla. Las características de la raíz, el brote, el follaje y la reproducción de la planta se comparan. No hay diferencias observables en los patrones de crecimiento y longitud de raíz entre plantas transgénicas y no transformadas. Las características del brote de la planta tales como la altura, el número y tamaño de las hojas, el tiempo de florecimiento, el tamaño floral y la apariencia son similares. En general, no hay diferencias morfológicas observables entre las líneas transgénicas y aquellas sin expresión de moléculas de ARNi objetivo cuando se cultivan *in vitro* y en tierra en el invernadero.

Ejemplo 15

Transgénico *Glycine max* compuesto por secuencias de plagas de hemípteros

De 10 a 20 plantas transgénicas Glycine max T_0 que albergan vectores de expresión para los ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID. NO: 115 o SEQ ID. NO 119 se generan como es conocido en el arte, incluyendo por ejemplo por tranformación mediada por *Agrobacterium*, como se indica a continuación. Las semillas maduras de soya (*Glycine max*) son esterilizadas durante la noche con gas de cloro durante 16 horas. Después de la esterilización con gas de cloro, las semillas se colocan en un recipiente abierto en una campana de flujo LAMINAR™ para disipar el gas de cloro. A

continuación, las semillas estériles son imbuidas con H_2O estéril durante 16 horas en la oscuridad utilizando una caja negra a 24 °C.

Preparación de soya con semilla dividida. La semilla de soya dividida que comprende una porción de un protocolo de eje embrionario necesitó la preparación de material de semilla de soya que es cortado longitudinalmente, usando una cuchilla #10 fijada a un bisturí, a lo largo del hilo de la semilla para separar y remover la capa de la semilla y dividirla en dos secciones de cotiledón. Se presta cuidadosa atención para extraer parcialmente el eje embrionario, en donde cerca de 1/2 - 1/3 del eje embrionario permanece adherido al final nodal del cotiledón.

Inoculación Las semillas de soya divididas que comprenden una porción parcial del eje embrionario se sumergen luego durante unos 30 minutos en una solución de *Agrobacterium tumefaciens* (por ejemplo, cepa EHA 101 o EHA 105) que contiene plásmido binario con SEQ ID. NO: 115 o SEQ ID. NO 119. La solución de *Agrobacterium tumefaciens* es diluida a una concentración final de λ = 0,6 OD_{650} antes de sumergir los cotiledones que contienen el eje embrionario.

Co-cultivo Después de la inoculación, la semilla de soya dividida se deja co-cultivar con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* por 5 días en un medio de co-cultivo (Wang, Kan. Protocolos de Agrobacterium. 2. 1. New Jersey: Humana Press, 2006. Impresión.) en una placa de Petri

cubierta con un trozo de papel de filtro.

Inducción del brote. Después de 5 días de co-cultivo, se lavan las semillas de soya divididas en medios líquidos de inducción de brote (SI) que consisten en sales B5, vitaminas B5, 28 mg/L de hierro, 38 mg/L de Na2EDTA, 30 g/L de sacarosa, 0,6 g/L MES, 1,11 mg/L BAP, 100 mg/L TIMENTIN™, cefotaxima de 200 mg/L y vancomicina de 50 mg/L (pH 5.7). Las semillas de soya divididas se cultivan luego en un medio de inducción de brote I(SI I) que contiene sales B5, vitaminas B5, agar Noble de 7 g/L, 28 mg/L de hierro, 38 mg/L de Na_2EDTA, 30 g/L de sacarosa, 0,6 g/L MES, 1,11 mg/L BAP, 50 mg/L TIMENTIN™, cefotaxima 200 mg/L, vancomicina de 50 mg/L (pH 5.7), con el lado plano del cotiledón hacia arriba y el extremo nodal del cotiledón incrustado en el medio. Después de 2 semanas de cultivo, los explantes de la semilla de soya dividida transformada son transferidos al medio de inducción de brote II (SI II) que contiene el medio SI I suplementado con 6 mg/L de glufosinato (LIBERTY®).

Alargamiento del brote. Después de 2 semanas de cultivo en el medio SI II, los cotiledones se extraen de los explantes y una almohadilla de lavado de brote que contiene el eje embrionario es suprimido al realizar un corte en la base del cotiledón. La almohadilla de brote aislada del cotiledón se transfiere al medio de alargamiento del brote (SE, por sus siglas en inglés). El medio SE se compone de sales MS, 28 mg/L de hierro, 38 mg/L de Na_2EDTA, 30 g/L de

sacarosa y 0,6 g/L de MES, 50 mg/L de asparragina, 100 mg/L de ácido L-piroglutámico, 0,1 mg/L de IAA, 0,5 mg/L de GA3, 1 mg/L de ribósido de zeatina, 50 mg/L de TIMENTIN™, cefotaxima de 200 mg/L, vancomycin de 50 mg/L, glufosinato de 6 mg/L, agar noble de 7 g/L, (pH 5,7). Los cultivos son transferidos a un medio SE fresco cada 2 semanas. Los cultivos se mantienen en una cámara de crecimiento CONVIRON™ a 24 °C con un fotoperiodo de 18 h a una intensidad de luz de 80-90 µmol/m2sec.

Enraizamiento Los brotes alargados que se desarrollaron de la almohadilla de brote del cotiledón son aislados al cortar el brote alargado en la base de la almohadilla de brote del cotiledón y sumergir el brote alargado en 1 mg/L de IBA (ácido 3-butírico indol) por 1-3 minutos para promover el enraizamiento. A continuación, los brotes alargados son transferidos al medio de enraizamiento (sales MS, vitaminas B5, 28 mg/L de hierro, 38 mg/L de Na_2EDTA, 20 g/L de sacarosa y 0,59 g/L de MES, 50 mg/L de asparagina, 100 mg/L de ácido L-piroglutámico, 7 g/L agar noble, pH 5.6) en bandejas phyta.

Cultivo Luego del cultivo en una cámara de crecimiento CONVIRON™ a 24 °C, fotoperíodo de 18 h, por 1-2 semanas, los brotes que han desarrollado raíces son transferidos a una mezcla de tierra en una copa de sundae cubierta y colocados en una cámara de crecimiento CONVIRON™ (modelos CMP4030 y CMP3244, Controlled Environments Limited,

Winnipeg, Manitoba, Canadá) bajo condiciones de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) con una intensidad de luz de 120-150 µmol/m^2sec bajo una temperatura constante (22 °C) y humedad (40-50%) para aclimatación de las plántulas. Las plántulas arraigadas son aclimatadas en copas de sundae durante varias semanas antes de ser transferidas al invernadero para más aclimatación y el establecimiento de plantas robustas de soya transgénica.

Otras 10-20 líneas independientes de *Glycine max* T_1 que expresan horquilla ARNds para una construcción de ARNi se obtienen para el desafío BSB. La horquilla ARNds puede derivarse según se establece en SEQ ID. NO: 119 o de lo contrario comprendiendo además SEQ ID. NO: 115. Estos son confirmados a través de RT-PCR u otros métodos de análisis molecular. Las preparaciones de ARN total de líneas T_1 independientes seleccionadas se utilizan opcionalmente para la RT-PCR con cebadores diseñados para unirse en el intrón ST-LS1 de la casette de expresión de la horquilla en cada una de las construcciones de ARNi. Además, los cebadores específicos para cada gen objetivo en una construcción de ARNi se utilizan opcionalmente para amplificar y confirmar la producción del ARNm pre-procesado necesaria para la producción de ARNsi *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión de la horquilla del ARN en cada planta transgénica *Glycine max*. El procesamiento de la horquilla ARNds de los genes objetivo en