

PRODUCCIÓN DE ARN EN PLANTAS SUPERIORES

Campo de la invención

La invención se refiere a la producción y el procesamiento de ARN en plantas superiores, que incluye la interferencia de ARN en plantas superiores, y a la expresión de genes en cloroplastos y plástidos relacionados de plantas superiores.

Antecedentes de la invención

La referencia a cualquier arte previo en la memoria descriptiva no constituye un reconocimiento ni una sugerencia de que dicho arte previo forma parte del conocimiento general común en ninguna jurisdicción, ni que pueda esperarse razonablemente que dicho arte previo sea entendido, considerado relevante y/o combinado con otros documentos del arte previo por parte del especialista en el arte.

La utilización de ARN del huésped para silenciar genes esenciales de una plaga cognada constituye un enfoque emergente para el control de plagas. Este enfoque se puede denominar '*interferencia de ARN trans-reino*' o '*ARNi trans-reino*'. En general, se entiende que, cuando el ARN de doble cadena (ARNdc) producido por el huésped es ingerido por la plaga, la maquinaria de interferencia de ARN (ARNi) de la plaga convierte el ARNdc ingerido en ARNsi, u otra forma de ARN que es capaz de inducir el silenciamiento de genes esenciales o eventos relacionados en la plaga, lo que tiene impacto en la sobrevivencia de la plaga. Véase: Terenius O. et al. 2011 J. Insect Physiol. 57:231–245 para obtener ejemplos de este enfoque aplicables a lepidópteros. La interferencia de ARN (ARNi) es un proceso que utiliza vía celulares endógenas, mediante el cual una molécula de ARN de interferencia (ARNi) (por ejemplo, una molécula de ARNdc) que es específica para la totalidad, o cualquier porción de tamaño adecuado, de una secuencia del gen blanco, da por

resultado la degradación del ARNm codificado por ésta. En los últimos años, el ARNi se ha usado para realizar el “derribo” génico (*knockdown*) en varias especies y sistemas experimentales; por ejemplo, *Caenorhabditis elegans*, plantas, embriones de insectos y células en cultivo tisular. Véase, por ejemplo, Fire *et al.* (1998) *Nature* 391:806–811; Waterhouse *et al.* (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13959–139; Wesley V *et al.* (2001) *Plant J.* 27: 581–590; Martinez *et al.* (2002) *Cell* 110:563–574; McManus and Sharp (2002) *Nature Rev. Genetics* 3:737–747.

Se ha establecido con certeza que se requieren altos niveles de ARNdc para obtener el silenciamiento de genes de plagas, incluidos genes de lepidópteros (Terenius O *supra*; Mao Y. *et al.* 2007 *Nat. Biotechnol.* **25**: 1307–1313; Kumar P. *et al.* 2012 *PLoS ONE* 7:e31347).

La patente WO2012/054919 es un estudio que transforma los cloroplastos y los núcleos de una planta inferior (*Chlamydomonas*) con constructos que contienen genes esenciales para la supervivencia del mosquito. Las *Chlamydomonas* transformadas se dan como alimento a los mosquitos para demostrar que se puede usar la alimentación para controlar las poblaciones de mosquitos.

Con la patente WO2012/054919 se descubre que tanto la transformación de cloroplastos como la transformación nuclear de las plantas inferiores proporciona una alimentación útil para el control de la población de mosquitos. En concreto, según la patente WO2012/054919, los resultados demuestran que la alimentación transgénica con *Chlamydomonas* que expresan repeticiones de 3HKT invertidas expresadas ya sea a partir de cloroplastos o bien por genoma nuclear fue eficaz para inhibir el crecimiento de larvas de mosquito y, por último, en causar su muerte (WO2012/054919 en [00219]).

En otro lado, a partir de estudios sobre transformantes nucleares, se formula la hipótesis de que el ARNdc se debe suministrar a los insectos mientras se alimentan del huésped por inducción del ARNi entre reinos.

Consultar Mao y Kumar, *supra*. Esto significa que el control de plagas eficaz necesita un huésped que produce y mantiene un nivel en estado estacionario de ARNdc de manera tal de cuando la plaga se alimenta de dicho huésped en un momento específico, el ARNdc está disponible para alimentar a la plaga. Cómo producir y mantener un nivel en estado estacionario de ARNdc en plantas superiores o inferiores continúa siendo una interrogante.

En plantas inferiores, la patente WO2012/054919 formula hipótesis en [00220] acerca de que la expresión del ARN de silenciamiento en cloroplastos puede ser importante para la inducción de ARNi transreinos. No obstante, la patente WO2012/054919 no concluye que si esto se debe a que la expresión de los cloroplastos permite un nivel en estado estacionario de ARN de silenciamiento o si es el envase de plástidos de los cloroplastos que protege el silenciamiento del ARN mientras se lo ingiere. La importancia del envase de plástidos ha sido propuesta por otros. Consultar Bogarad L. 2000 TIBTECH 18: 257– 263; McBride K *et al.*, 1995 Nature Biotechnology 13: 362–365; Verma D y Daniell H 2007 Am Soc Plant Biol. 145:1129–1143.

Continúa sin clarificación de la patente WO2012/054919 si el ARN que se expresa en los transformantes de los cloroplastos de la planta inferior constan de ARNdc. En concreto, la patente WO2012/054919 no mide el ARNdc ni el ARNpi en los transformantes de los cloroplastos de las *Chlamydomonas* ni en los insectos que ingieren esos transformantes. Por ende, la patente WO2012/054919 no muestra que se pueda producir ARNdc en los cloroplastos de las *Chlamydomonas* ni en plantas inferiores en cantidades suficientes para facilitar la ribointerferencia ARNi transreinos.

Además, la patente WO2012/054919 sugiere que el ARNdc se produce en los transformantes nucleares de las *Chlamydomonas* como este transformante, según la patente WO2012/054919 fue tan útil para la inducción de ribointerferencia ARNi transreinos como un transformante de cloroplasto. Como el ARNdc es esencial para la ribointerferencia ARNi transreinos, una

consecuencia puede ser que el ARNdc sea más capaz de acumularse en el núcleo de una planta inferior que en el núcleo de una planta superior. Esto indicaría una divergencia en las rutas de procesamiento del ARN en las plantas inferiores y las superiores. Hay muchos ejemplos de las diferencias de los procesamientos del ARN entre las plantas inferiores y las superiores. Ver en particular: Casas-Mollano J. et al. 2008 Genetics **179**: 69–81. Sobre la base de que los transformantes de cloroplastos y nucleares acumulan ARNdc de igual forma, parece ser que la leve diferencia en eficacia de los transformantes de cloroplastos y nucleares por inducción de ribointerferencia ARNi transreinos se debería al envase plástido exclusivo de los cloroplastos más que a la mayor acumulación de ARN de silenciamiento en el plástido. Esta es de hecho una hipótesis de la patente WO2012/054919 en [00220].

Más importante, el envase plástido no es en sí mismo un mecanismo que permite la producción y el mantenimiento de un nivel en estado estacionario de ARNdc. El envase sólo protege lo que se produjo después de la ingestión. Por lo tanto, se entiende que el envase plástido en sí mismo no es suficiente para la producción de niveles elevados de ARNdc que es sabido que son necesarios para la inducción de ribointerferencia ARNi transreinos.

Otra diferencia importante entre las rutas de procesamiento del ARN de los cloroplastos de las plantas inferiores y superiores, tal como se ejemplifica con las *Chlamydomonas*, es que no tienen un sistema de edición de ARN, mientras que ese sistema está presente en las rutas de procesamiento del ARN de los cloroplastos de las plantas superiores. Ver Stern et al. 2010 Annu. Rev. Plant Biol. **61**:125–55. Por ende, se entiende que el ARN que corresponde al gen objetivo de una plaga afín que se produjo en los cloroplastos de una planta inferior tiene la misma secuencia del gen pertinente de la plaga objetivo y aumenta la posibilidad de formación de un ARNpi de secuencia específica adecuada en la plaga y la inducción de ribointerferencia ARNi transreinos. La presencia de un sistema de edición de ARN en los cloroplastos de las plantas

superiores plantea la cuestión de si tal resultado podría ser posible si se usan transformantes de cloroplastos de plantas superiores.

Tal como se detalló, resulta difícil mantener un nivel en estado estacionario de ARNdc en organismos superiores porque se degrada con gran rapidez. En plantas superiores se cree que esta degradación implica al ARNpi, pero también podrían participar otros mecanismos no definidos todavía relacionados con la ribointerferencia ARNi u otros mecanismos diferentes.

Ha habido algunos avances en la comprensión de las rutas de procesamiento del ARN en los cloroplastos de las plantas superiores. No obstante, se desconoce la gran mayoría. Los investigadores preguntan a menudo por qué la expresión de tan pocos genes, menos de 100 en un genoma de cloroplasto típico, es tan compleja. Ver Stern *supra*.

Se entiende que las rutas de procesamiento del ARN de los cloroplastos de las plantas superiores son diferentes de las de los núcleos celulares de las plantas superiores y el citosol. Esto se debe a que el plástido es de origen procariótico mientras que los núcleos de las células vegetales y el citosol son eucarióticos. Algunos creen que los cloroplastos, en carácter de derivados de un ancestro cianobacteriano, combinan características procarióticas y eucarióticas de la expresión de los genes que está regulada por muchas proteínas codificadas en el núcleo. Ver Stern *supra*. No obstante, se desconoce el grado en el que las rutas son diferentes y la relevancia de tales diferencias para el procesamiento de ARN.

Algunos han sugerido que debido a las diferencias entre procariotas y eucariotas, aquellos mecanismos que se sabe que funcionan en células eucarióticas pero no en procarióticas no deberían funcionar en los cloroplastos. La ribointerferencia ARNi es un mecanismo específico. Al mismo tiempo, otros han observado la presencia de ARNpi derivado de los ARN que se acumulan en el cloroplasto e indican los mecanismos de ribointerferencia ARNi que funcionan en el cloroplasto. Ver Martínez de Alba A.E. et al. 2002 Am. Soc

Microbiol. 76: 13094–13096. Más aún, un cloroplasto homólogo de la ribonucleasa RNasa III también puede participar en el procesamiento del ARNm. La ribonucleasa RNasa III es un miembro de una gran familia de endorribonucleasas dependientes del ARNdc que incluyen enzimas relacionadas con el silenciamiento de ARN tal como Dicer. Ver: Stern *supra*. La observación de factores derivados del núcleo en los cloroplastos tal vez no es sorprendente dado que el descubrimiento de muchos factores que actúan sobre el *trans* codificado del núcleo en el cloroplasto incluye los factores de edición y ajuste de ARN.

En general, no se sabe cómo se controla el nivel en estado estacionario del ARN de un gen endógeno en los cloroplastos de las plantas superiores. Tampoco se conoce si los mecanismos relevantes se podrían aplicar igual a la expresión de genes exógenos en los cloroplastos de las plantas superiores. Más aún, se desconoce el impacto de la sobreexpresión de los transgenes en un cloroplasto en niveles en estado estacionario de ARN. Tal vez es por estas razones que muchos han adoptado el enfoque de ribointerferencia ARNi transreinos en plantas superiores sobre la base de la transformación nuclear, ya que se tiene mayor conocimiento de la maquinaria de procesamiento del ARN del núcleo en plantas superiores y el resultado es predecible.

Estos estudios se centraron en principio en el uso de células que no tienen maquinaria de procesamiento de ARNdc y evitar así la degradación del ARNdc. Un problema fue el impacto sobre el crecimiento de una planta que no tiene maquinaria de procesamiento del ARNdc. Este problema se mejoró con la provisión de constructos modificados que permiten la formación y la protección del ARNdc en el núcleo de las plantas superiores. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses US20090263364, US20070011775, US20090263364, US20080194504; US20060095987. Fenner B. *et al.* 2006 J. Virol. 80: 6822–6833; y Salomon W. *et al* 2010 Nucl. Acids. Res. 38: 3771–3779. Estas mejoras y descubrimientos sobre los constructos que inducen la

ribointerferencia ARNi han establecido una transformación nuclear evidente como enfoque preferido para la producción de ARNdc para ribointerferencia ARNi transreinos.

Subsiste la necesidad de enfoques alternativos o mejorados para la producción y acumulación de ARNdc en plantas superiores.

Resumen de la invención

La invención busca abordar la necesidad mencionada en lo que precede y en una forma de realización proporciona un plástido de una planta vascular, plástido que comprende lo siguiente:

- un constructo de ácido nucleico que incluye lo siguiente:
 - una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);
 - un promotor que funciona en el plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc;
- donde el ARNdc tiene una secuencia que permite la producción de ARNpi a partir del ARNdc.

En otra forma de realización se proporciona un plástido para una planta vascular, plástido que comprende lo siguiente:

- un constructo de ácido nucleico que incluye lo siguiente:
 - una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);
 - un promotor que funciona en el plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc;
- donde la región codificadora tiene una secuencia de nucleótido que no se encuentra en el genoma de la planta.

En otra forma de realización se proporciona un plástido para una planta vascular, plástido que comprende lo siguiente:

- un constructo de ácido nucleico que incluye lo siguiente:

- una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);
- un promotor que funciona en el plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc;
- donde el plástido no comprende moléculas de ARNpi que incluyen una secuencia de ARNdc.

En otra forma de realización se proporciona un plástido para una planta vascular, plástido que comprende lo siguiente:

- un constructo de ácido nucleico que incluye lo siguiente:
 - una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);
 - un promotor que funciona en el plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc;
- ARNdc
- donde el ARNdc contiene casi todas las secuencias de nucleótidos que codifica la región codificadora.

En otras formas de realización se proporciona un constructo de ácido nucleico para la transformación de una planta vascular que comprende lo siguiente:

- una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);
- un promotor que funciona en el plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc;
- uno o más sitios de integración selectivos para la integración del constructo en el genoma de un plástido de una planta vascular;
- donde el ARNdc tiene una secuencia que permite la producción de ARNpi a partir del ARNdc.

En otras formas de realización se proporciona un constructo de ácido nucleico para la transformación de una planta vascular que comprende lo siguiente:

- una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);
- un promotor que funciona en el plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc;
- uno o más sitios de integración selectivos para la integración del constructo en el genoma de un plástido de una planta vascular;
- donde la región codificadora tiene una secuencia de nucleótido que no se encuentra en el genoma de la planta.

En otras formas de realización se proporciona una planta o material de propagación derivado de ella que contiene un plástido o un constructo tal como se describe en lo que precede.

En otras formas de realización se proporciona un método para acumular ARNdc en una célula de una planta vascular, método que incluye lo siguiente:

- transformar un plástido de una planta vascular con un constructo de ácido nucleico de cualquiera de las formas de realización descritas en lo que precede;
- proporcionar condiciones para la producción de células de ARNdc en el plástido a partir de un constructo de ácido nucleico, y acumular así ARNdc en una célula de una planta vascular.

Otros aspectos de la invención y otras formas de realización de los aspectos que se describen en los párrafos que preceden resultarán evidentes con la descripción siguiente, que se provee a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos que la acompañan.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1A. Diagrama esquemático de las maneras de producir ARNdc o ARN horquillado (ARNh) a partir de la integración en los genomas de los cloroplastos o nucleares.

Figura 1A-1. Dos unidades de transcripción independientes en las cuales una produce un transcripto sentido y la otra produce un transcripto antisentido (tal como se detalló por primera vez en Waterhouse PM *et al.* 1998 Proc Natl Acad Sci USA 95: 13959–139). Las unidades de transcripción puede estar ubicadas juntas en el genoma (como las que producen las unidades introducidas en el mismo ADN–T) o en ubicaciones no relacionadas (como en cromosomas distintos). Los ARN sentido y antisentido deben encontrarse e hibridarse para formar el ARNdc.

Figura 1A-2. Una secuencia de “región codificadora” se coloca entre dos promotores “orientados hacia adentro o convergentes” (como se describieron por primera vez en Timmons L y Fire A. 1998 Nature 395: 854) de manera tal que uno causa la transcripción de una hebra de ADN para producir ARN sentido y el otro promotor dirige la transcripción de la otra hebra de ADN para producir el ARN antisentido. Los dos ARN deben encontrarse e hibridarse para formar el ARNdc.

Figura 1A-3. Una unidad de transcripción impulsada por un promotor que genera una sola hebra de ARN que tiene la capacidad de plegarse e hibridarse a sí misma para formar un ARN horquillado ARNh con un trono de estructura bicatenaria que recuerda al ARNdc (tal como se describió por primera vez en Waterhouse *et al.* 1998 Proc Natl Acad Sci USA 95: 13959–139). La primera región del transcripto puede tener orientación sentido con respecto a la última región del transcripto (o viceversa). Es importante contar con una región “espaciadora” para separar las regiones sentido y antisentido a

fin de estabilizar al constructo de ADN. En esta instancia, la región espaciadora se transcribirá como parte del transcripto de ARNh y formará un bucle.

Figura 1A–4. Una unidad de transcripción impulsada por un promotor que genera una sola hebra de ARN que tiene la capacidad de plegarse e hibridarse a sí misma para formar un ARN horquillado ARNh con un tronco de estructura bicatenaria que recuerda al ARNdc. La primera región del transcripto puede tener orientación sentido con respecto a la última región del transcripto (o viceversa). Es importante contar con una región “espaciadora” para separar las regiones sentido y antisentido a fin de estabilizar al constructo de ADN. En esta instancia, la región espaciadora codifica a un intrón que se transcribe pero que luego se ajusta para producir un transcripto de ARNh con un bucle muy pequeño (tal como se describió por primera vez en Smith NA *et al* 2000 Nature 407: 319–320).

Figura 1B. Diagrama esquemático de los constructos de integración nuclear cuando se integran al genoma nuclear. El constructo de transformación nuclear v153 se muestra en su forma integrada. Este constructo está diseñado para expresar la horquilla Ha–HpAce1236–189 del promotor CaMV 35s. El esqueleto es una derivación del vector de transformación binaria estándar *Agrobacterium* pORE–03. El sitio de integración en el genoma nuclear huésped varía según la dinámica de integración estándar de la transformación mediada por *Agrobacterium*. Los cebadores que se usan para los pasos subsiguientes de síntesis de ADNc (301r, 216f/r y oligo dT) y los pasos de detección de transcripción inversa de reacción en cadena por la polimerasa RT–PCR (217f/r + 216 f/r y 25f + 216 f/r) se muestran con los tamaños de productos esperados (e=..) indicados para los últimos grupos. Se muestran los productos y estructuras de ARN esperados que incluyen los de las especies que se producen permanecen al seguir el ajuste de intrones y los que siguen el procesamiento de las rutas estándar de tipo ARNi de las que se sabe que funcionan en los ARN citoplasmático o nuclear estándar.

Figura 1C. Diagrama esquemático de los constructos de expresión de los cloroplastos (con intrón nuclear) cuando se integran con el genoma del cloroplasto. El constructo de transformación de cloroplastos v206 se muestra en su forma integrada. Este constructo está diseñado para expresar la horquilla Ha–HpAce1236–189 del promotor Prn. El esqueleto es una derivación del vector de transformación estándar de cloroplastos pPRV323Clox. El sitio de integración en el genoma del cloroplasto huésped es preciso y se define mediante las regiones de recombinación incluidas en trnI / trnA. Los cebadores que se usan para los pasos subsiguientes de síntesis de ADNc (301r, 216f/r, 276r, 280r y oligo dT) y los pasos de detección RT–PCR (217f/r + 216 f/r y 25f + 216 f/r) se muestran con los tamaños de los productos esperados (e=.) indicados para los últimos grupos. Se muestra el producto producido de ARN esperado. En este caso, el intrón nuclear o citoplasmático no se ajusta ya que el estándar de la maquinaria de ajuste no funciona en el cloroplasto. En la ausencia adicional de la maquinaria de procesamiento de ARNi, el producto remanente incluye una parte considerable de la secuencia o toda la secuencia tal como se incluyó en principio para cubrir el objetivo previsto por la horquilla diseñada. En este caso, se pueden formar especies de ARN adicional más largas si la transcripción puede continuar ("leer todo") de unidades de transcripción nativas cadena arriba, como se sabe que sucede por lo habitual en muchos transcriptos de cloroplastos.

Figura 1D. Diagrama esquemático de los constructos de expresión de los cloroplastos (con intrón de cloroplasto) cuando se integran con el genoma del cloroplasto. El constructo de transformación de cloroplastos v301 se muestra en su forma integrada. Este constructo está diseñado para expresar la horquilla Ha–HpAce1236–189 del promotor Prn. El esqueleto es una derivación del vector de transformación estándar de cloroplastos pPRV323Clox. El sitio de integración en el genoma del cloroplasto huésped es preciso y se define mediante las regiones de recombinación incluidas en trnI /

trnA. Los cebadores que se usan para los pasos subsiguientes de síntesis de ADNc (301r, 216f/r, 276r, 280r y oligo dT) y los pasos de detección RT-PCR (217f/r + 216 f/r y 25f + 216 f/r) se muestran con los tamaños de los productos esperados (e=..) indicados para los últimos grupos. Se muestra el producto de ARN esperado y la estructura producida. En este caso el intrón de cloroplasto incluido se ajustará en el cloroplasto. En la ausencia de la maquinaria de procesamiento del ARNi, el producto remanente incluye una parte considerable de la secuencia o toda la secuencia tal como se incluyó en principio para cubrir el objetivo previsto por la horquilla diseñada pero no la secuencia de intrón. Como resultado del ajuste, es posible que la estructura de ARN forme un ARN bicatenario con forma de vara con un bucle pequeño en un extremo. En este caso, se pueden formar especies de ARN adicional más largas si la transcripción puede continuar ("leer todo") de unidades de transcripción nativas cadena arriba, como se sabe que sucede por lo habitual en muchos transcritos de cloroplastos.

Figura 2. RT-PCR de extractos de ARN de transformantes que demuestran la expresión de los transgenes. Se muestran los resultados de 6 ensayos diferentes de transcripción inversa (RT) con muestras de ARN extraídas de tejido vegetal transformado de cloroplastos de *Nicotiana benthamiana* (v206 muestras Nro. 1 a 9), tejido nuclear transformado de *N. benthamiana* (v153 muestra nuclear de control Nro. 17) y tejido no transformado de *N. benthamiana* (muestra de control no transformada Nro. 24). Cada muestra se amplificó con 3 grupos diferentes de cebadores, con 2 condiciones de modelo, el ARN extraído antes de la síntesis del ADNc como modelo (para probar la posibilidad de contaminación con ADN en las muestras) y los grupos de muestra de ADNc correspondientes. Los tamaños esperados de los productos se indican como e=.. El marcador incluido es un marcador MBI Fermentas 100 bp con bandas a intervalos de 100 bp desde 100 bp hasta 1 kb. **(A-B)** El primer grupo de cebador PCR se diseñó para amplificar a través

del intrón y de la unión del tronco posterior para detectar la presencia de especies de ARN largas que contengan el bucle del intrón en el tronco antisentido (AS) (cebadores g25f y g216f/r). La región encajonada indica el área en la que aparecerá un producto si hay una amplificación específica. **(C–D)** El segundo grupo estaba en la región interna del tronco de ARNdc, pero unido en los extremos del tronco para detectar la presencia de troncos sentido (SE) o antisentido (AS) de longitud completa independiente de la secuencia de bucle (cebadores g216f/r y g217f/r). **(E–F)** El tercer grupo fue una reacción de control para detectar la presencia de secuencias de mantenimiento ubicuas para eIF4E (cebadores g165f y g166r).

La muestra Nro. 9 de cloroplastos no se analizó en este grupo. No obstante, ya se había confirmado positiva en ensayos PCR anteriores.

Figura 3. Cuantificación del ARNdc en transformantes de cloroplastos y controles basada en el método Northern.

Las muestras de transformación de cloroplastos se sometieron a un análisis Northern de alto peso molecular (MW) o 'ARN largo'. **(A)** Las extracciones de ARN se prepararon para cada una de las muestras Nro. 1–9, 17 y 24 (cada muestra se resuspendió en formamida). Se cargaron aproximadamente 10µl de cada muestra + 6µl de formamida colorante de carga de ARN por línea (excepto la muestra 7, donde sólo había disponibles 4 µl de muestra) en un gel de agarosa TBE (Tris–borato–EDTA (etilen–diamino tetraacético)) al 1,4 % TBE y se corrió a 100 V hasta que los 2 frentes de colorante más bajos estuvieron listos para la separación. El gel se tiñó con bromuro de etidio (EtBr) y se visualizó para calibrar las cantidades de carga relativas. **(B)** El gel se transfirió por capilaridad durante la noche a una membrana Hybond N+ (Amersham) y las muestras se reticularon bajo luz UV sobre la membrana. La membrana se prehibridó e hibridó con PerfectHyb a 65 °C. La sonda (longitud total de 538 nucleótidos nt con ~ 357 nt combinados por contigüidad a HaAce) fue una hebra SE de longitud parcial ribosonda UTPp32

con deslave SP6 de un vector HaAce1236 pGEM insertado en forma inversa (v158). La membrana se expuso durante 1 hora. **(C)** Las cantidades de ARN se cuantificaron con ImageJ y se normalizaron a las cantidades cargadas (con la imagen de EtBr). Los niveles de expresión relativa se calcularon como cambios de pliegue normalizados en intensidad de banda relativos al control no transformado de *N. benthamiana* (establecido en 1).

La muestra Nro. 6 se omitió en este grupo de ejemplos ya que no hubo material remanente suficiente para extracciones adicionales de ARN.

Figura 4. Cuantificación del ARNpi en transformantes de cloroplastos y controles basada en el método Northern. Las muestras de transformación de cloroplastos se sometieron a análisis Northern de bajo peso molecular (MW) o 'ARN pequeño' y se cuantificaron las cantidades relativas de los productos procesados del tamaño del ARNpi. Aquí se usaron las mismas extracciones de ARN que se usaron en el ejemplo 4. **(A)** Se cargaron aproximadamente 25 µl de cada muestra + 25 µl de formamida colorante de carga de ARN por línea sobre un gel PAGE de electroforesis en gel de poliacrilamida al 17 %. Esto dio como resultado un rango estimado de cantidad cargada de ~ 18 – 42 ug. Antes de la carga, el gel PAGE se corrió antes a 150 V / 40 m. Una vez cargado, el gel se corrió a 150V / ~30 m + 200 V / ~4–5 horas (hasta que el frente de colorante migró de manera adecuada). El gel se tiñó con bromuro de etidio (EtBr) y se visualizó para calibrar las cantidades de carga relativas. **(B)** El gel se transfirió por electrólisis a 45 V / 60 m sobre una membrana Hybond N+ (Amersham) y las muestras se reticularon bajo luz UV sobre la membrana. La membrana se prehibridó e hibridó con PerfectHyb a 42 °C. La sonda se preparó de la misma manera que se describió en lo que precede, salvo que también fue 'carbonatada' por métodos estándar para fraccionarla en fragmentos de ~ 50 nt. La membrana se expuso durante 1 hora y 60 horas, con ninguna diferencia en el límite de detección entre los 2 puntos de tiempo (aquí se muestra el punto de 1 hora de tiempo). **(C)** Las cantidades de ARN se cuantificaron con ImageJ

y se normalizaron las cantidades cargadas (con la imagen de EtBr). Los niveles de expresión relativa se calcularon como cambios de pliegue normalizados en intensidad de banda relativos al control no transformado de *N. benthamiana* (establecido en 1).

Las muestras Nro. 6 y 7 se omitieron en este grupo de ejemplos ya que el material remanente era insuficiente.

Figura 5a Tasa de crecimiento de larvas de *Helicoverpa armigera* en plántulas transgénicas y no transgénicas.

El peso promedio de las larvas de *Helicoverpa* (n = 4–13; original n = 20 / tratamiento al comienzo del experimento) luego de 4 días de alimentación con plántulas lavadas de entre 6 y 10 días de edad en placas de Petri de plástico. Las placas de Petri que contienen las plántulas infectadas con las larvas se mantuvieron en condiciones de medio controlado (28 °C, ~ 60% de humedad relativa, 16:8 [luz:oscuridad]). Estos datos muestran que en las cuatro líneas independientes transformadas con v206 (que expresa ARNh en el cloroplasto), las larvas se redujeron en forma significativa ($p < 0,005$ n = 7 – 13) en su tasa de crecimiento en comparación con aquellas que se alimentaron con plántulas del tipo salvaje de *N. benthamiana*. La tasa de crecimiento de las larvas que se alimentaron de dos líneas transformadas con v153 (que expresa el ARNh en el núcleo o el citoplasma) no presentó diferencia significativa ($p > 0,9$; n = 4 – 7) con respecto a las alimentadas con wt.

Figura 5b. Diagrama esquemático de la ruta de relación de los vectores a los que se hace referencia en la presente. Los constructos de transformación de cloroplastos agrupados en el ejemplo 1 fueron derivados de varios vectores preexistentes, pPRV323Clox, pORE–03 y pRNAi–GG. El vector pPRV323Clox se modificó primero para eliminar un sitio Kpn I RE erróneo. En él se insertó un promotor de cloroplastos, 5' UTR, MCS y 3' UTR, para crear pR1. El pORE–03 se modificó en primera instancia por la inserción de un promotor CaMV 35s más la eliminación del sitio Bsa I presente en el esqueleto para crear p32c. El

pRNAi-GG se usó como fuente del casete de clonación Golden Gate (GG). El casete GG se copió en p32c para crear p32c-GG. El p32c-GG se usó entonces en una reacción GG para crear un constructo horquilla contra el gen objetivo de acetilcolinesterasa de *Helicoverpa armigera* (Ha-Ace1236-189), v153. El v153 fue el constructo que se usó en el ejemplo de transformación nuclear. Este constructo se usó además para transferir el elemento GG Ha-HpAce1236-189 en el pR1 y crear así v206. El v206 fue el constructo que se usó en el ejemplo de transformación de cloroplastos.

Figura 6. Secuencias ejemplares. (A) La secuencia de ARNm para el gen de acetilcolinesterasa (Ac) de *Helicoverpa armigera* (Ha) que corresponde al Nro. de acceso a Genbank: AF369793 (el gen objetivo). (B) Ha-Ace1236-189, derivado de la secuencia del gen de Ac de Ha (la secuencia objetivo). (C) Ha-HpAce1236-189, la horquilla de la secuencia Ha-Ace1236-189, que usa las regiones espaciadoras de intrón tal como se presentan en pRNAi-GG. La secuencia que se muestra es la secuencia tal como aparece en el constructo de ADN (antes del ajuste) desde los extremos terminales de la secuencia objetivo.

Figura 7. Mapa de plásmido para v153.

Figura 8. Secuencia de nucleótidos para v153

Figura 9. Mapa de plásmido para v206 modificado

Figura 10. Secuencia de nucleótidos para v206 modificado

Figura 11. Mapa de plásmido para v301

Figura 12. Secuencia de nucleótidos para v301

Descripción detallada de las formas de realización

La ribointerferencia ARNi transreinos surgió en años recientes como una manera eficaz de inhibir el crecimiento de plagas y patógenos de las plantas en la agricultura. Este enfoque explota las rutas de procesamiento del ARN e muchos organismos eucarióticos en los que el ARNdc exógeno se procesa en

moléculas pequeñas de interferencia (ARNpi) mediante enzimas celulares de ribonucleasa RNasa III (por ejemplo, Dicer o proteínas similares a Dicer tales como DCL1, DCL2, DCL3 y DCL4). DICER ajusta moléculas largas de ARNdc en moléculas de ARNpi que por lo general tienen aproximadamente entre 19 y 24 nucleótidos de longitud que luego se desenrollan en dos hebras simples de ARN: la hebra pasajero y la hebra guía. La hebra pasajero se degrada y la hebra guía se incorpora al complejo de silenciamiento inducido del ARN (*RNA-induced silencing complex*, RISC). El silenciamiento del gen postranscripción ocurre cuando la hebra guía se une específicamente a una secuencia complementaria de una molécula de ARNm e induce el ajuste con Argonaut, el componente catalítico del complejo RISC.

La ribointerferencia ARNi transreinos explota esta ruta de procesamiento del ARN endógeno al proporcionar las moléculas de ARNdc a un organismo objetivo en el cual no se producen las moléculas de ARNdc, pero se producen en otro organismo, por ejemplo, un organismo que el organismo objetivo consume. Algunas de las formas de producir moléculas de ARNdc o de ARNh se muestran en la Figura 1A. Un ejemplo de este enfoque es la provisión de moléculas de ARNdc en plantas en las cuales las moléculas de ARNdc son homólogas a los genes objetivo específicos en el organismo objetivo. Se entiende que cuando la plaga ingiere el ARNdc que produce la planta, la maquinaria de ribointerferencia (ARNi) del ARN de la plaga convierte el ARNdc ingerido en ARNpi u otra forma de ARN que es capaz de inducir en la plaga silenciamiento de genes esencial o eventos relacionados que tienen impacto en la supervivencia de la plaga. Este enfoque también se conoce como ‘ribointerferencia ARNi autónoma no celular’ y se diferencia de la situación en la cual la molécula de ARNdc se produce, procesa y ejerce su efecto de silenciamiento, todo en una sola célula.

Un enfoque para proporcionar moléculas de ARNdc en una célula huésped es introducir un constructo en el núcleo de la célula huésped que,

cuando se expresa en el genoma del huésped, codifica una molécula de ARNdc. También se ha reconocido que proporcionar moléculas de ARNdc a un organismo huésped, la propia maquinaria de procesamiento del ARN del organismo huésped puede degradar las moléculas de ARNdc en moléculas de ARNpi. Como tal, el ARNpi que es capaz de inducir silenciamiento de genes en una peste se puede producir en la planta. No obstante, es bien sabido que a fin de que la ribointerferencia ARNi transreinos sea eficaz se deben proporcionar niveles elevados de ARNdc al organismo objetivo. En este sentido, los esfuerzos recientes en metodologías de ribointerferencia ARNi transreinos se han centrado en medios de estabilizar las moléculas de ARNdc producidas en el núcleo de la célula huésped a fin de prevenir tal procesamiento del ARNpi. Por ejemplo, algunos han sugerido la provisión de una molécula ligante a ARN para prevenir la degradación. Otros han sugerido la necesidad de aumentar el nivel de expresión del ARNdc en el núcleo de la célula huésped a fin de compensar cualquier pérdida debida al procesamiento en ARNpi. Otros incluso han sugerido la modificación química de las moléculas de ARNdc. Lo que queda claro es que se han hecho todos los esfuerzos para rectificar esta situación acerca de modificar las metodologías de transformación nuclear existentes.

Los inventores tomaron un enfoque distinto para solucionar el problema de la degradación del ARNdc y han encontrado de manera sorprendente que el ARNdc que se produce en un plástido de una planta vascular, por ejemplo un cloroplasto, no es susceptible de la misma degradación o procesamiento que el ARNdc que se produce en el núcleo de la misma célula. Más importante, los inventores descubrieron que es posible acumular ARNdc en una planta vascular al transformar de manera selectiva los cloroplastos de las plantas vasculares. Más aún, los inventores descubrieron que los cloroplastos generados según la invención tienen virtualmente ningún contenido de ARNpi, lo que resulta ventajoso para la aplicación de la invención en aplicaciones de

ribointerferencia ARNi transreinos. Más aún, los inventores descubrieron que el ARNdc acumulado en los cloroplastos se procesa de otra manera por otras rutas de procesamiento del ARN de los cloroplastos. Asimismo, los inventores descubrieron que las larvas que se alimentan de plantas transgénicas que expresan ARNpi, en el cloroplasto, cuyo objetivo es un gen larval esencial tiene un efecto inhibitorio muy fuerte sobre el crecimiento de dichas larvas.

Los descubrimientos de los inventores son sorprendentes porque hasta ahora no se sabía si los plástidos degradaban las moléculas de ARNdc en moléculas de ARNpi con enzimas similares a Dicer. Por ejemplo, algunos han especulado que la presencia en las células vegetales del ARNpi que corresponde a viroides que replican cloroplastos indica la presencia de maquinaria de procesamiento similar a Dicer en los cloroplastos de las plantas superiores. Los inventores de la presente han descubierto, sin embargo, que las moléculas de ARNdc producidas en los plástidos de las plantas superiores no se procesan en ARNpi dentro del plástido. En consecuencia, los inventores descubrieron que el plástido de una planta vascular proporciona un entorno adecuado para la producción de niveles altos de ARNdc.

Por consiguiente, en una primera forma de realización, la invención proporciona un plástido de una planta vascular que comprende lo siguiente:

- un constructo de ácido nucleico que incluye lo siguiente:
 - una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);
 - un promotor que funciona en el plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc;
- donde el ARNdc tiene una secuencia que permite la producción de ARNpi a partir del ARNdc.

En general, el ARNpi se produce a partir de una molécula de ARNdc mediante una enzima ribonucleasa RNasa III celular (por ejemplo, Dicer) que ajusta moléculas largas de ARNdc en moléculas de ARNpi que tienen en

general aproximadamente entre 19 y 24 nucleótidos de longitud. En general, las secuencias del ARNdc que tienen una estructura de dos hebras de menos de entre 19 y 24 nucleótidos de longitud no permiten la producción de ARNpi a partir de ellas.

Las moléculas de ARNdc producidas según la invención retienen por ende una parte considerable de sus propiedades incipientes que en general son necesarias para producir ARNpi a partir de ARNdc. En otras palabras, la molécula de ARNdc retiene las propiedades que permiten que la maquinaria de ribonucleasa RNasa III del organismo objetivo se unan a la molécula de ARNdc y produzcan una molécula de ARNpi a partir de ella. Es en este contexto que el ARNdc producido según la invención tiene una secuencia que permite la producción de ARNpi a partir de ella. Esto se explica en mayor detalle a continuación, aunque antes de pasar a dicha explicación, resulta útil analizar más la índole del ARNdc.

De manera específica, el ARNdc incluye en general una primera hebra de ARN y una segunda hebra de ARN que tienen suficiente complementariedad de secuencias entre ellas para permitir que la primera y la segunda hebras se unan entre sí mediante apareamiento Watson–Crick de bases para formar un '*tronco*'. En algunas formas de realización, un tronco de ARNdc consiste en complementariedad del 100% entre la primera y la segunda hebras. En algunas forma de realización, puede haber uno o más desajustes entre la primera y la segunda hebras que forman el tronco de manera tal que la complementariedad entre las hebras del tronco puede ser menor que el 100%. En general el nivel de complementariedad entre la primera y la segunda hebras del tronco es mayor que el 80%, de preferencia del 85%, de preferencia del 90%, de preferencia del 95, 96, 97, 98 o 99%. En general los desajustes se dan a lo largo de una secuencia contigua de no más de aproximadamente 3 nucleótido, de preferencia aproximadamente 2 nucleótidos. De preferencia, un

desajuste se limita a nucleótidos simples de la primera y la segunda hebras del tronco en ubicaciones distantes entre sí.

Según lo que precede, se entiende que un tronco de ARNdc de longitud definida puede de hecho incluir una o más regiones o posiciones de desajuste. Por ejemplo, cuando la primera y la segunda hebras tienen complementariedad perfecta a lo largo de una región de 30 nucleótidos y presenta sólo uno o dos desajustes dentro de la región de 30 nucleótidos, se dice que la primera y la segunda hebras constituyen un tronco de ARNdc de 30 nucleótidos.

Un ARNdc puede incluir uno o más troncos. Donde hay más de un tronco, éstos se pueden disponer en series o racimos para formar un tándem o repeticiones invertidas superpuestas que forman estructuras de ARNdc que recuerdan, por ejemplo, a una estructura de dos troncos que se asemeja a una "cabeza de martillo", una "barra" o un "hueso de perro", o una estructura que contiene 3 o más troncos que recuerdan a una "hoja de trébol" o una estructura con una forma similar a un nudo. Cualquiera de estos constructos puede incluir además segmentos espaciadores que se encuentran dentro de un tronco de doble cadena (por ejemplo, como un espaciador entre varios segmentos de secuencias de nucleótidos sentido o antisentido o un espaciador entre un segmento de secuencias de nucleótidos de nucleótidos antisentido de apareamiento de bases y un segmento de secuencias de nucleótidos sentido) o fuera de un tronco de doble cadena (por ejemplo, como una región bucle de secuencias de ARN no relacionadas sentido o antisentido que separa un par de repeticiones invertidas). En casos en los que el segmento de secuencias de nucleótidos sentido y antisentido con apareamiento de bases es de longitud desigual, el segmento más largo funciona como un espaciador.

El ARNdc puede surgir de una hebra simple de ARN que tiene secuencias repetidas que permiten que la hebra simple de ARN forme una estructura tronco. Como alternativa, el ARNdc puede surgir de 2 o más

moléculas de ARN que se alinean y aparean sus bases entre sí para formar una molécula tronco de ARNdc.

Tal como se analiza en lo que precede, es la longitud del ARNdc, en especial la longitud del tronco del ARNdc, lo que permite la producción del ARNpi a partir de él. En general un tronco de ARNdc tiene una longitud de al menos 30 nucleótidos. En longitudes menores que 30 nucleótidos puede haber limitaciones en la medida en la que los sistemas de polimerasa III de ARN de los organismos de las plagas pueden generar ARNpi a partir de ARNdc. En varias formas de realización, los troncos de ARNdc pueden constar de al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 300 o incluso más pares de bases. En una forma de realización preferida, el ARNdc incluye al menos aproximadamente 100 pares de bases. En otra forma de realización preferida, el tronco de ARNdc incluye al menos aproximadamente 250 pares de bases, o incluso más, por ejemplo, 500 o 1000 pares de bases.

El ARNdc se codifica mediante una región codificadora. La región codificadora es una secuencia de ácidos nucleicos exógena. En algunas formas de realización, la región codificadora puede codificar un transgen. En algunos ejemplos, un transgen puede ser una secuencia que codifica una o ambas hebras de la molécula de ARNdc que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una molécula de ácido nucleico que se encuentra en un organismo que comprende una secuencia de genes objetivo. En incluso otro ejemplo, un transgen puede ser una secuencia de genes (por ejemplo, un gen de tolerancia a herbicidas), un gen que codifica a un biomarcador relevante para un mecanismo de acción de una enfermedad, un compuesto farmacéuticamente útil o un gen que codifica un rasgo agrícola deseable.

En estos y otros ejemplos, un transgen puede contener secuencias reguladoras unidas en función de una secuencia de codificación del transgen (por ejemplo, un promotor). Los ejemplos se describen en mayor detalle a continuación.

En algunas formas de realización, la región codificadora puede modificar en esencia un ARN de cadena simple o doble e incluye varias series de segmentos de secuencias de nucleótidos antisentido que son antisentido para al menos un segmento del gen objetivo y varias series de segmentos de secuencias de nucleótidos sentido que son sentido para al menos un segmento del gen objetivo; las series de varios segmentos antisentido y varios segmentos sentido pueden formar un tronco único de ARN de cadena doble o varios troncos de cadena doble en serie (con o sin ADN espaciador sin apareamiento por base que separa los varios troncos de cadena doble).

En otra forma de realización, la región codificadora codifica varios troncos de ARNdc e incluye varios segmentos de secuencias antisentido que son antisentido para al menos un segmento del gen objetivo y varios segmentos de secuencias sentido que son sentido para al menos un segmento del gen objetivo, y donde dichos varios segmentos de secuencias de nucleótidos antisentido y dichos varios segmentos de secuencias sentido están dispuestos en una serie de troncos de cadena doble.

En ciertas formas de realización, el ARNdc se puede referir a uno o ambos ARNdc y ARNh.

La molécula de ARNdc que codifica la región codificadora puede tener una secuencia que permite la producción de moléculas de ARNpi que se dirigen a una plaga o un patógeno específicos de la planta vascular. Como tal, la secuencia de nucleótidos de la región codificadora será complementaria de un gen objetivo de un organismo objetivo y no corresponderá a una secuencia de nucleótidos de la planta huésped.

De la misma manera, en otra forma de realización se proporciona un plástido de una planta vascular, plástido que comprende lo siguiente:

- un constructo de ácido nucleico que incluye lo siguiente:
 - una región codificadora para codificar una molécula de ARNdc;
 - un promotor que funciona en el plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc;
- donde la región codificadora tiene una secuencia de nucleótido que no se encuentra en el genoma de la planta.

En general la región codificadora tiene una secuencia de nucleótidos de un gen objetivo. Los genes objetivo preferidos son aquellos genes que son esenciales para la supervivencia de la plaga relevante. La plaga puede ser del reino vegetal, animal, bacteriano, virósico o micótico. En estas formas de realización, el ARNdc permite la producción de moléculas de ARNpi que ya sea ajustan o bien reprimen la traducción del ARNm del gen objetivo. Los ejemplos de las plagas y los genes objetivos son los siguientes:

- plagas de coleópteros que incluyen, por ejemplo, *Diabrotica virgifera virgifera* de LeConte (gusano de la raíz del maíz del oeste (*western corn rootworm*, "WCR")), *Diabrotica barberi* de Smith y Lawrence (gusano de la raíz del maíz del norte (*northern corn rootworm*, "NCR")), *Diabrotica undecimpunctata howardi* de Barber (gusano de la raíz del maíz del sur (*southern corn rootworm*, "SCR")), *Diabrotica virgifera zea* de Krysan y Smith (gusano de la raíz del maíz de México (*Mexican corn rootworm*, "MCR")), *Diabrotica balteata* de LeConte; *Diabrotica undecimpunctata tenella*, *D. speciosa* de Germar y *Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata* de Mannerheim;
- plagas de hemípteros que incluyen, por ejemplo, *Euschistus heros* (Fabr.) (pudenta marrón neotropical (*Neotropical Brown Stink Bug*, "BSB")), *Nezara viridula* (L.) (pudenta verde del sur), *Piezodorus*

- guildinii* (Westwood) (pudenta de bandas rojas), *Halyomorpha halys* (Stål) (pudenta marmolada marrón), *Chinavia hilare* (Say) (pudenta verde), *Euschistus servus* (Say) (pudenta marrón), *Dichelops melacanthus* (Dallas), *Dichelops furcatus* (F.), *Edessa meditabunda* (F.), *Thyanta perditor* (F.) (pudenta de hombros rojos neotropical), *Chinavia marginatum* (Palisot de Beauvois), *Horcias nobilellus* (Berg) (chinche del algodón), *Taedia stigmosa* (Berg), *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Méneville), *Neomegalotomus parvus* (Westwood), *Leptoglossus zonatus* (Dallas), *Niesthrea sidae* (F.), *Lygus hesperus* (Knight) (chinche manchada de las plantas) y *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois);
- plagas de lepidópteros que incluyen, por ejemplo, *Ostrinia nubilalis* (taladro del maíz europeo), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero de otoño), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Spodoptera ornithogalli* (gusano soldado de bandas amarillas), *Helicoverpa zea* (gusano del maíz), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa armigera* (oruga del capullo de algodón), *Diatraea saccharalis* (taladro de la caña de azúcar), *Diatraea grandiosella* (taladro del maíz del sudoeste), *Elasmopalpus lignosellus* (taladro del tallo del maíz menor), *Papaipema nebris* (taladro del tallo), *Pectinophora gossypiella* (oruga rosada del algodón), *Plathypena scabra* (gusano verde de la soja), *Colias eurytheme* (mariposa amarilla de la alfalfa), *Anticarsia gemmatalis* (oruga del frijol terciopelo), *Pseudoplusia includens* (gusano falso medidor de la soja), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Agromyza parvicornis* (minador de las hojas del maíz), *Achoroia grisella*, *Acleris gloverana*, *Acleris variana*, *Adoxophyes orana*, *Alabama argillacea*, *Alsophila pometaria*, *Amyelois transitella*, *Anagasta kuehniella*, *Anarsia*

lineatella, *Anisota senatoria*, *Antheraea pernyi*, *Archips* sp., *Argyrotaenia* sp., *Athetis mindara*, *Bombyx mori*, *Bucculatrix thurberiella*, *Cadra cautella*, *Choristoneura* sp., *Cochyls hospes*, *Corcyra cephalonica*, *Cydia latiferreanus*, *Cydia pomonella*, *Datana integerrima*, *Dendrolimus sibericus*, *Desmia feneralis*, *Diaphania hyalinata*, *Diaphania nitidalis*, *Ennomos subsignaria*, *Eoreuma loftini*, *Esphestia elutella*, *Erannis tilaria*, *Estigmene acrea*, *Eulia salubricola*, *Eupocoellia ambiguella*, *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Euxoa messoria*, *Galleria mellonella*, *Grapholita molesta*, *Harrisina americana*, *Helicoverpa subflexa*, *Hemileuca oliviae*, *Homoeosoma electellum*, *Hyphantia cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Lambdina fiscellaria fiscellaria*, *Lambdina fiscellaria lugubrosa*, *Leucoma salicis*, *Lobesia botrana*, *Loxostege sticticalis*, *Lymantria dispar*, *Macalla thyrisalis*, *Malacosoma* sp., *Mamestra brassicae*, *Mamestra configurata*, *Manduca quinquemaculata*, *Manduca sexta*, *Maruca testulalis*, *Melanchra picta*, *Operophtera brumata*, *Orgyia* sp., *Paleacrita vernata*, *Papilio cresphontes*, *Phryganidia californica*, *Phyllonorycter blancardella*, *Pieris napi*, *Pieris rapae*, *Platynota flouendana*, *Platynota stultana*, *Platyptilia carduidactyla*, *Plodia interpunctella*, *Pontia protodice*, *Pseudaletia unipuncta*, *Sabulodes aegrotata*, *Schizura concinna*, *Sitotroga cerealella*, *Spilonta ocellana*, *Thaurnstopoea pityocampa*, *Ensola bisselliella*, *Trichoplusia hi*, *Udea rubigalis*, *Xylomyges curiails*, *Yponomeuta padella* y *Heliothis virescens* (gusano del brote del tabaco); y

- plagas de nematodos que incluyen, por ejemplo, *Aphelenchoides* spp., *Belonolaimus* spp., *Criconemella* spp., *Ditylenchus* spp., *Globodera* spp., *Heterodera* spp., *Hirschmanniella* spp., *Hoplolaimus* spp., *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. y

Radopholus spp., una lista no taxativa de sp. específicas incluyen, a título enunciativo y no taxativo, *Dirofilaria immitis*, *Globodera pallida*, *Heterodera glycines*, *Heterodera zea*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Onchocerca volvulus*, *Pratylenchus penetrans*, *Radopholus similis* y *Rotylenchulus reniformis*.

En ejemplos específicos se revelan moléculas ejemplares de ácidos nucleicos que pueden ser homólogos de al menos una parte de una o más secuencias de ácidos nucleicos nativos de una plaga de coleópteros, hemípteros y/o lepidópteros o un organismo que no es una plaga de insectos (por ejemplo un nematodo parásito), que incluye, a título enunciativo y no taxativo, Caf1–180 (publicación de solicitud de patentes estadounidense Nro. 2012/0174258), VatpaseC (publicación de solicitud de patente estadounidense Nro. 2012/0174259), Rho1 (publicación de solicitud de patente estadounidense Nro. 2012/0174260), VatpaseH (publicación de solicitud de patente estadounidense Nro. 2012/0198586), PPI–87B (publicación de solicitud de patente estadounidense Nro. 2013/0091600), RPA70 (publicación de solicitud de patente estadounidense Nro. 2013/0091601), RPS6 (publicación de solicitud de patente estadounidense Nro. 2013/0097730), ROP (publicación de solicitud de patente estadounidense Nro. 14/577811), RNAPII (publicación de solicitud de patente estadounidense Nro. 14/577854) y/o lo que se revela en las publicaciones de las patentes estadounidenses Nros. 2012/0164205, 2011/0054007 y 2009/0265818, la patente estadounidense Nro. 6,326,193, las solicitudes de patentes europeas Nros. EP1210875 y EP2633048 y las solicitudes de patentes , internacionales protegidas por el Tratado de cooperación en materia de patentes PCT Nros. WO2011153418, WO2007080126, WO2012143542, WO2005110068 y WO2006047495; o un evento transgénico del cual se transcribe una molécula de ARNdc dirigida a un gen en una plaga de coleópteros, hemípteros y/o lepidópteros, o un organismo

que no es un insecto (por ejemplo, un nematodo parásito de plantas, tal como, por ejemplo, los que se revelan en las solicitudes de patentes estadounidenses Nros. 2005/0188438, 2006/0080749, 2009/0300796 y las solicitudes de patentes internacionales protegidas por PCT Nros. WO2003052110, WO2004066183, WO2004005485, WO2005019408, WO2006046148, WO2007087153, WO2007095496 y WO2009133126).

En algunas formas de realización, el constructo de ácido nucleico puede incluir más de una región codificadora para la codificación del ARNdc. Por ejemplo, el constructo de ácido nucleico puede incluir una primera región codificadora para codificar un primer ARNdc para un primer gen objetivo de insecto y una región codificadora más para codificar otro ARNdc para otro gen objetivo de insecto.

En otras formas de realización, un plástido o cloroplasto de acuerdo con la invención puede incluir uno o más tipos de constructo de ácido nucleico. Por ejemplo, un plástido o cloroplasto de acuerdo con la invención puede incluir lo siguiente:

- un primer constructo de ácido nucleico que incluye una primera región codificadora para codificar un primer ARNdc para un primer gen objetivo de insecto;
- otro constructo de ácido nucleico que incluye otra región codificadora para codificar otro ARNdc para otro gen objetivo de insecto.

La primera y la otra regiones codificadoras y los ARNdc que se producen en cada una de ellas pueden ser iguales o diferentes.

Más aún, la primera y la otra regiones codificadoras pueden estar bajo el control del mismo promotor o la misma secuencia reguladora, o distintos promotores y distintas secuencias reguladoras. En una forma de realización, la primera región codificadora puede estar bajo el control de un promotor constitutivo y la otra región codificadora puede estar bajo el control de un promotor inducible.

En otras formas de realización, tanto la primera como la otra regiones codificadoras están bajo el control de promotores constitutivos o bajo el control de promotores inducibles. Los ejemplos de promotores específicos útiles para la expresión del ARNdc en cloroplastos y plástidos se describe a continuación.

El grado mínimo de reconocimiento que se espera que tenga efecto de silenciamiento puede ser entre una secuencia en el tronco de una horquilla y la secuencia en el ARNm que comparte al menos un bloque mayor que 16 o más nucleótidos de identidad perfecta en un bloque de secuencia continua de 19 nucleótidos.

En otras formas de realización, el gen objetivo es un gen para el cual se necesita la ribointerferencia ARNi o el gen de silenciamiento. Tal gen puede ser uno que se exprese en la patología de la enfermedad. En otro ejemplo, el gen puede ser uno que se expresa en un proceso industrial.

Es sabido que cuando las moléculas de ARNdc se proporcionan en el citoplasma de una planta vascular (ya sea mediante expresión de los constructos de ADN en el núcleo o bien de otra manera) las moléculas de ARNdc son reconocidas por las enzimas Dicer en el citoplasma y se procesan en ARNpi. No obstante, los inventores han descubierto que el ARNdc proporcionado en los plástidos de estas mismas plantas no está sujeto al mismo procesamiento. Por consiguiente, las moléculas de ARNdc producidas de acuerdo con la presente invención no se procesan en ARNpi y los plástidos no implican a las moléculas de ARNpi derivadas de la secuencia de la molécula de ARNdc.

De la misma manera, en otra forma de realización se proporciona un plástido de una planta vascular, plástido que comprende lo siguiente:

- un constructo de ácido nucleico que incluye lo siguiente:
 - una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);

- un promotor que funciona en el plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc;
- donde el plástido no comprende en esencia moléculas de ARNpi que incluyen una secuencia de ARNdc.

En general el plástido no contiene moléculas de ARNpi que incluyen una secuencia de ARNdc, aunque se entiende que en algunas formas de realización el plástido puede contener productos de degradación obtenidos de la degradación o el catabolismo del ARN y puede contener de otra manera cierta cantidad de ARNpi que no tiene consecuencia en la producción ni acumulación de ARNdc en el plástido.

Se ha especulado si los plástidos de las plantas vasculares puede incluir homólogos de las enzimas ribonucleasas citoplasmáticas conocidas como RNasa III (“Dicer”). Más aún, es sabido que el ARN de los cloroplastos a menudo se somete a considerable edición de ARN. En consecuencia, no se sabía hasta ahora si el ARNdc proporcionado en un plástido de una planta vascular podría retener de manera considerable toda la secuencia de nucleótidos de un gen objetivo que se codifica con un constructo de ADN. Los inventores descubrieron con sorpresa que los cloroplastos de las plantas superiores no realizan una edición sustancial del ARNdc transcripto a partir de una región codificadora para un gen objetivo ni se da un truncamiento ni un ajuste del ARNdc transcripto a partir de la región codificadora.

De la misma manera, en otra forma de realización se proporciona un plástido de una planta vascular, plástido que comprende lo siguiente:

- un constructo de ácido nucleico que incluye lo siguiente:
 - una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);
 - un promotor que funciona en el plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc;
- ARNdc

– donde el ARNdc contiene casi todas las secuencias de nucleótidos que codifica la región codificadora.

En general el ARNdc no está procesado en el sentido en que no se sometió a modificación postranscripción que pudiera eliminar las regiones del ARNdc necesarias para la formación de una estructura de tronco. En algunas formas de realización, el ARNdc se modificó para eliminar las regiones 5' o 3' no traducidas o una cola poli A. En algunas formas de realización, el ARNdc se modificó para eliminar las regiones de no complementariedad tales como las que se observaron que forman una estructura de bucle, tal como en un ARN horquilla.

La presente invención tiene utilidad especial para proporcionar niveles altos de moléculas de ARNdc para usar en aplicaciones de ribointerferencia ARNi transreinos. Tal como se detalló en lo que precede, ahora se admite que a fin de que la ribointerferencia ARNi transreinos tenga éxito, se deben proporcionar niveles elevados de ARNdc al organismo objetivo. Un descubrimiento importante en especial de la invención es que el ARNdc que se produce en el plástido no puede pasar del plástido al citosol. Esto es importante en dos aspectos. Primero, al permanecer en el plástido, el ARNdc es capaz de acumularse en grandes cantidades dentro del plástido. Segundo, como el plástido impide toda interacción con el citosol, el ARNdc no puede inducir la ribointerferencia ARNi citosólica que podría tener un impacto final en el ARNdc producido en el plástido, o producir un impacto en el crecimiento y la producción de la planta. De hecho, el plástido permite la producción de ARNdc en circunstancias que de otra manera inducirían la ribointerferencia ARNi.

Por lo tanto, de acuerdo con la invención, se entiende que el ARNdc se acumula en el plástido de una planta vascular y queda retenido en el plástido de tal manera que el ARNdc no puede salir del plástido hacia el citosol y, por ende, no puede inducir la ribointerferencia ARNi en el citosol.

En las forma de realización que se describen en lo que precede, el plástido puede ser un cloroplasto, un cromoplasto, un leucoplasto o un proplástido. En general, el plástido es un cloroplasto. Una mitocondria es una organela no plástido que también puede contener un constructo de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

En otras forma de realización se proporciona un ARNdc que se produce con un plástido o un cloroplasto tal como se detalla en lo que precede.

B. Constructos de ácidos nucleicos

En una forma de realización, la invención proporciona un constructo de ácido nucleico para la transformación de una planta vascular que comprende lo siguiente:

- una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);
- un promotor o que funciona en un plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc en un plástido;
- uno o más sitios de integración selectivos para la integración del constructo en el genoma de un plástido de una planta vascular;
- donde el ARNdc tiene una secuencia que permite la producción de ARNpi a partir del ARNdc.

En particular, el constructo se puede transformar en un plástido de la planta. El constructo comprende una región codificadora que, con la expresión del ARN forma o produce una molécula de ARNdc que se puede usar para inhibir la expresión del gen objetivo en otro organismo. A fin de iniciar o mejorar la expresión, dichos constructos de ácidos nucleicos pueden comprender una o más secuencias reguladoras, que pueden funcionar unidas a la secuencia de ácido nucleico capaz de expresarse como ARNdc.

En formas de realización específicas, un constructo de ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNdc. En muchas formas de realización, una molécula

transcripta de ARNdc se puede proporcionar en forma estabilizada; por ejemplo, como una estructura horquilla y tronco y bucle.

Un constructo de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNdc puede comprender al menos dos secuencias de nucleótidos con una secuencia de codificación dispuesta de manera tal que una secuencia de nucleótidos tiene orientación sentido y la otra secuencia de nucleótidos tiene orientación antisentido en relación a al menos un promotor, en el cual la secuencia de nucleótidos sentido y la secuencia de nucleótidos antisentido están unidas o conectadas por una secuencia espaciadora de desde aproximadamente cinco (~5) hasta aproximadamente mil (1000) nucleótidos. La secuencia espaciadora puede formar un bucle entre las secuencias sentido y antisentido. La secuencia de nucleótidos sentido o la secuencia de nucleótidos antisentido pueden ser bastante homólogas a la secuencia de nucleótidos de un gen objetivo o un fragmento de ella. En algunas formas de realización, sin embargo, una molécula de constructo de ácido nucleico puede codificar a una molécula de ARNdc sin una secuencia espaciadora. En formas de realización, una secuencia de codificación sentido y una secuencia de codificación antisentido pueden tener longitudes diferentes.

Las secuencias que se identificaron útiles para facilitar la ribointerferencia ARNi transreinos se pueden incorporar con facilidad en moléculas de ARNdc mediante la creación de casetes de expresión adecuados en un constructo de ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, tales secuencias se pueden expresar como una estructura de horquilla con un tronco y un bucle al tomar el primer segmento que corresponde a la secuencia de gen objetivo que une esta secuencia a una segunda región espaciadora de segmento que no es homóloga ni complementaria del primer segmento; y unirlo a un tercer segmento, en el que al menos una parte del tercer segmento es bastante complementario del primer segmento. Tal constructo forma una estructura de tronco y bucle por hibridización del primer segmento con el tercer

segmento, donde la estructura de bucle forma el segundo segmento. Ver, por ejemplo, la publicación de las patentes estadounidenses Nros. US 2002/0048814 y US 2003/0018993; y las publicaciones de las patentes internacionales protegidas por PCT Nros. WO94/01550 y WO98/05770.

En una forma de realización preferida, una secuencia espaciadora a la que se hace referencia en lo que precede puede tener la secuencia de un intrón, en especial la secuencia de un intrón de un gen del genoma de un cloroplasto o un plástido. Los ejemplos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Intrones presentes en genes codificadores de proteínas de coloplastos de plantas de tierra

Gen	Especie	Tamaño de intrón (bp)	Referencia
<i>atpF</i>	<i>Triticum aestivum</i>	823	Bird et al. (1985)
<i>atpF</i>	<i>Spinacea oleracea</i>	764	Hennig and Herrmann (1986)
<i>atpF</i>	<i>Pisum sativum</i>	690	Hudson et al. (1987)
<i>atpF</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	695	Shinozaki et al. (1986a)
<i>atpF</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>	588	Ohyama et al. (1986)
<i>ndhA</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	1,242	Shinozaki et al. (1986c)
<i>ndhA</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>	713	Ohyama et al. (1986)
<i>ndhB</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	757	Shinozaki et al. (1986c)
<i>ndhB</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>	537	Ohyama et al. (1986)
<i>petB</i>	<i>Triticum aestivum</i>	744	S. Hird, unpublished
<i>petB</i>	<i>Pisum sativum</i>	810	C. Eccles, unpublished
<i>petB</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	759	Shinozaki et al. (1986c)
<i>petB</i>	<i>Spinacea oleracea</i>	777	Westhoff et al. (1986)
<i>petB</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>	495	Fukuzawa et al. (1987)
<i>petD</i>	<i>Triticum aestivum</i>	746	S. Hird, unpublished
<i>petD</i>	<i>Pisum sativum</i>	715	C. Eccles, unpublished
<i>petD</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	742	Shinozaki et al. (1986c)
<i>petD</i>	<i>Spinacea oleracea</i>	743	Heinemeyer et al. (1984)
<i>petD</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>	493	Fukuzawa et al. (1987)
<i>rpl16</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	1,020	Shinozaki et al. (1986c)
<i>rpl16</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>	536	Ohyama et al. (1986)
<i>rpl2</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	666	Shinozaki et al. (1986c)
<i>rpl2</i>	<i>Nicotiana debneyi</i>	666	Zurawski et al. (1984)
<i>rpl2</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>	545	Ohyama et al. (1986)
<i>rps12</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>		Fromm et al. (1986)
exons I-II		trans-split	Torazawa et al. (1986)
exons II-III		540	
<i>rps12</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>		Fukuzawa et al. (1986)
exons I-II		trans-split	
exons II-III		499	
<i>rps16</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	860	Shinozaki et al. (1986b)
<i>rpoC</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>	597	Ohyama et al. (1986)

De Introns in chloroplast protein-coding genes of land plants. AINE L. PLANT & JOHN C. GRAY Photosynthesis Research 16:23-39 (1988)

Los intrones de cloroplastos o plástidos que se procesan por los cloroplastos o los plástidos pueden tener la ventaja especial en ciertas formas de realización ya que pueden permitir que los cloroplastos o los plástidos produzcan un ARN horquilla que tenga un bucle más pequeño que puede ser

un mejor sustrato para el DICER de insecto y enzimas relacionadas asociadas con la ribointerferencia ARNi de insectos.

En otra forma de realización preferida, la secuencia espaciadora puede tener la secuencia de señales de ajuste de consenso para ajustar un intrón de un transcripto de ARN primario de un plástido. En esta forma de realización, las señales de ajuste consecuentes pueden flanquear a la secuencia espaciadora que no tiene en sí misma la secuencia del intrón del cloroplasto.

Las formas de realización de la invención incluyen la introducción de un constructo de la presente invención en un plástido (es decir, transformación) para lograr niveles en estado estacionario de expresión de una o más moléculas de ARNdc. Un constructo de ácido nucleico puede, por ejemplo, ser un vector tal como un plásmido lineal o circular cerrado. El sistema de vector puede ser un vector único o un plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma del plástido de un huésped. Además, un vector puede ser un vector de expresión. Las regiones codificadoras de la invención pueden, por ejemplo, insertarse de forma adecuada en un vector bajo el control de un promotor adecuado que funciona en uno o más huéspedes para impulsar la expresión de una secuencia codificadora unida u otra secuencia de ADN. Hay muchos vectores disponibles para estos fines y la selección del vector adecuado dependerá en gran medida del tamaño del ácido nucleico que se va a insertar dentro del vector y el plástido específico que se va a transformar en el vector. Cada vector contiene varios componentes que dependen de su función (por ejemplo, amplificación de ADN o expresión de ADN) y de la célula huésped o la organela subcelular específicas con las cuales es compatible.

Un vector es una molécula de ácido nucleico introducida en una célula para producir una célula transformada, por ejemplo. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en la célula huésped, tal como en origen de una replicación. Los ejemplos de vectores incluyen, a

título enunciativo y no taxativo: plásmidos; cósmidos; bacteriófagos; o virus que transportan el ADN exógeno dentro de una célula. Un vector puede incluir también uno o más genes, secuencias antisentido y/o genes de marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en el arte. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula y, por ende, causar que la célula exprese las moléculas de ácido nucleico y/o proteínas que codifica el vector. Como opción, un vector puede incluir materiales para ayudar a lograr el ingreso de la molécula de ácido nucleico dentro de la célula (por ejemplo, liposoma, cubierta de proteínas, etc.).

Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en un plástido de la célula huésped. De preferencia, las secuencias permiten que el vector se replique en un plástido de una célula huésped, pero no en el citosol ni en el núcleo de la célula huésped.

En una forma de realización, el constructo de ácido nucleico incluye las secuencias de ácido nucleico que permiten la integración del transgen que comprende en el genoma del plástido de la célula huésped. De preferencia, el constructo de ácido nucleico está adaptado para que el transgen se integre de manera selectiva o, al menos, preferible en el genoma del plástido más que en el genoma nuclear. Por ello en una forma de realización el constructo de ácido nucleico contiene secuencias que permiten la integración en el genoma de un plástido de una célula huésped, pero no en el genoma del núcleo de la célula huésped. Los ejemplos de regiones de integración son trnV-3' – rps12, trnI – trnA, and trnfM – trnG. Los ejemplos de sitios de integración específicos son: trnH/pbA, trnG/trnfM, ycf3/trnS, rbcL/accD, petA/psbJ, 5'rps12/clpP, petD/rpoA, ndhB/rps7, 3'rps12/trnV, trnV/rrn16, rrn16/trnI, trnI/trnA, trnN/trnR y rpl32/trnL.

A fin de permitir la expresión (es decir, transcripción) de las moléculas de ARNdc en los plástidos, el constructo de ácido nucleico puede comprender una región codificadora de una molécula de ARNdc que puede funcionar unida a una o más secuencias reguladoras, tales como una secuencia de promotor

heterólogo que funciona en un plástido en el cual se va a expresar el constructo de ácido nucleico.

Una primera secuencia de nucleótidos funciona unida a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico tiene una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Cuando se producen por recombinación, las secuencias de ácido nucleico que funcionan unidas están en general contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones de codificación de proteínas, están en el mismo marco de lectura (por ejemplo en un marco abierto de lectura (ORF) policistrónico). No obstante, los ácidos nucleicos deben estar contiguos para funcionar unidos.

El término "funcionar unidos", cuando se usa en referencia a una secuencia reguladora y una secuencia codificadora, significa que la secuencia reguladora afecta la expresión de la secuencia codificadora unida. Las "secuencias reguladoras" o los "elementos de control" se refieren a secuencias de nucleótidos que influyen la sincronización y el nivel o cantidad de la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN o la traducción de la secuencia codificadora asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores; traducciones de secuencias líder; intrones; potenciadores; estructuras de tronco y bucle; secuencias de unión represoras; secuencias de terminación; secuencias de reconocimiento de poliadenilación; etc. Las secuencias reguladoras específicas se pueden ubicar cadena arriba y/o cadena abajo de una secuencia codificadora que funciona unida a ellas. Además, las secuencias reguladoras específicas que funcionan unidas a una secuencia codificadora pueden estar ubicadas en la hebra complementaria asociada de una molécula de ácido nucleico de cadena doble.

Tal como se lo usa en la presente, el término "promotor" se refiere a una región del ADN que puede estar cadena arriba del inicio de la transcripción y puede formar parte del reconocimiento y la unión de la polimerasa del ARN y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un promotor puede funcionar unido

a una secuencia codificadora para su expresión en una célula, o un promotor puede funcionar unido a una secuencia de nucleótidos que codifican una secuencia de señal que puede funcionar unida a una secuencia codificadora para su expresión en una célula. Un "promotor de una planta" puede ser un promotor capaz de iniciar la transcripción en células vegetales. Los ejemplos de promotores en control de desarrollo incluyen los promotores que de preferencia inician la transcripción en ciertos tejidos tales como hojas, raíces, semillas, vasos de xilema, traqueidas o esclerénquima. Tales promotores se conocen como "preferidos del tejido". Los promotores que inician la transcripción sólo de ciertos tejidos se conocen como "específicos del tejido".

Un promotor "específico del tipo de célula" impulsa en principio la expresión en ciertos tipos de células en uno o más órganos, por ejemplo, células vasculares en raíces u hojas. Los promotores que inician la transcripción sólo en ciertas organelas subcelulares (por ejemplo, tales como las mitocondrias o los cloroplastos u otros plástidos) se conocen como promotores "específicos de plástidos", "específicos de cloroplastos" o "específicos de mitocondrias", según el caso. Se entiende que algunos promotores pueden iniciar la transcripción en más de una ubicación subcelular.

En una forma de realización preferida en particular, el constructo de ácido nucleico contiene un promotor o elemento regulador que funciona en un plástido y no contiene un promotor o elemento regulador que funcione en el núcleo ni el citosol ni otras organelas de la célula huésped.

Un promotor "inducible" puede ser un promotor que se encuentra bajo control del entorno. Los ejemplos de las condiciones del entorno que pueden iniciar la transcripción mediante promotores inducibles incluyen condiciones anaeróbicas y la presencia de luz. Los promotores específicos del tejido, preferidos del tejido, específicos del tipo de célula e inducibles constituyen la clase de promotores "no constitutivos". Un promotor "constitutivo" es un

promotor que puede estar activo en la mayoría de las condiciones ambientales o en la mayoría de los tipos de células o tejidos.

Cualquier promotor inducible se puede usar en alguna de las formas de realización de la invención. Ver Ward *et al.* (1993) Plant Mol. Biol. 22:361–366. Con un promotor inducible, la velocidad de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, a título enunciativo y no taxativo: Los promotores del sistema de inhibidores convertidores de la enzima angiotensina (*angiotensin converting enzyme inhibitors*, ACEI) que responden al cobre; el gen In2 del maíz que responde a los protectores de herbicidas de bencensulfonamida; el represor Tet del transposón 10 TnIO; y el promotor inducible de un gen de hormona esteroide, cuya actividad transcripcional se puede inducir mediante la hormona glucocorticosteroide (Schena *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:0421).

Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, a título enunciativo y no taxativo: promotores de virus vegetales, tal como el promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor (*cauliflower mosaic virus*, CaMV); promotores de genes de actina del arroz; promotores de ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 del maíz; y el promotor ALS, XbaI/NcoI fragmento 5' del gen estructural ALS3 de *Brassica napus* (o una secuencia de nucleótidos similar a dicho fragmento XbaI NcoI) (Publicación de patente internacional protegida por PCT Nro. WO 96/30530).

Además, se puede usar cualquier promotor específico de tejidos o preferido de los tejidos en alguna forma de realización de la invención. Las plantas transformadas con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia codificadora que funciona unida a un promotor específico de tejidos puede producir el producto de la secuencia codificadora, en exclusiva o de preferencia, en un tejido específico. Los ejemplos de promotores específicos de tejidos o preferidos de tejidos incluyen, a título enunciativo y no taxativo: un promotor preferido de raíces, tal como el del gen faseolina; un promotor

específico de hojas e inducido por la luz tal como el de cab o rubisco (Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa–Oxigenasa); un promotor específico de antera tal como el de LAT52; un promotor específico de polen tal como el de ZmJ3; y un promotor preferido de microesporas tal como el de apg.

Los promotores adecuados para usar en constructos de la invención incluyen aquellos que son inducibles, virales, sintéticos o constitutivos, todos ellos bien conocidos en el arte. Los ejemplos no taxativos que describen tales promotores incluyen las patentes estadounidenses Nros. 6.437.217 (promotor RS81 del maíz); 5.641.876 (promotor de la actina del arroz); 6.426.446 (promotor RS324 del maíz); 6.429.362 (promotor PR–1 del maíz); 6.232.526 (promotor A3 del maíz); 6.177.611 (promotores constitutivos del maíz); 5.322.938, 5.352.605, 5.359.142 y 5.530.196 (promotor 35S); 6.433,252 (promotor oleosina L3 del maíz); 6.429.357 (promotor 2 actina del arroz e intrón 2 actina del arroz); 6.294.714 (promotores inducibles por la luz); 6.140.078 (promotores inducibles por la sal); 6.252.138 (promotores inducibles por patógenos); 6.175.060 (promotores inducibles por deficiencia de fósforo); 6.388.170 (promotores bidireccionales); 6.635.806 (promotor de la coixina gamma); y la solicitud de patente estadounidense Nro. 09/757.089 (promotor de aldolasa de cloroplasto en el maíz). Los promotores adicionales incluyen el promotor de nopalina sintasa (NOS) (Ebert *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745–9) y el promotor de octopina sintasa (OCS) (ambos son transportados en plásmidos de *Agrobacterium tumefaciens* que inducen tumores de); los promotores de caulimovirus tales como el promotor 19S virus de mosaico de la coliflor (CaMV) (Lawton *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. 9:315–24); el promotor 35S del CaMV (Odell *et al.* (1985) Nature 313:810–2); el promotor 35S del virus de mosaico de la escrofularia (Walker *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19):6624–8); el promotor de la sacarosa sintasa (Yang y Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144–8); el promotor del complejo genético R (Chandler *et al.* (1989) Plant Cell 1:1175–83); el promotor

de gen de la proteína de unión a/b de la clorofila; CaMV35S (patentes estadounidenses Nros. 5.322.938, 5.352.605, 5.0359.142 y 5.530.196); FMV35S (patentes estadounidenses Nros. 6.051.753 y 5.378.619); un promotor PC1SV (patente estadounidense Nro. 5.850.019); el promotor SCP1 (patente estadounidense Nro. 6.677.503); y los promotores AGRtu.nos (GenBank Acceso Nro. V00087; Depicker *et al.* (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:561–73; Bevan *et al.* (1983) Nature 304:184–7).

En formas de realización específicas, los constructos de ácidos nucleicos de la invención comprenden un promotor específico de tejidos, tal como un promotor específico de raíces. Los promotores específicos de raíces impulsan la expresión de secuencias que funcionan unidas con exclusividad a los tejidos de las raíces o con preferencia por dichos tejidos. Los ejemplos de promotores específicos de raíces son conocidos en el arte. Ver, por ejemplo las patentes estadounidenses Nros. 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 formas de realización, una región que codifica a una molécula de ARNdc se puede clonar entre dos promotores específicos de raíces, que funcionan en una célula de planta transgénica y se expresan allí para producir moléculas de ARNdc en la célula o el plástido de la planta transgénica.

Las secuencias reguladoras adicionales que pueden funcionar unidas de manera opcional a una molécula de ácido nucleico de interés incluyen a los 5' UTR ubicados entre una secuencia de promotor y una secuencia de codificador que funcionan como una secuencia líder de traducción. La secuencia líder de traducción está presente en el ARNm procesado por completo y puede afectar el procesamiento del transcripto primario y/o la estabilidad del ARN. Los ejemplos de secuencias líder de traducción incluyen líderes de proteínas de choque térmico (patente estadounidense Nro. 5.362.865), líderes de proteínas de envoltura de virus vegetal y otras. Ver, por ejemplo, Turner y Foster (1995)

Molecular Biotech. 3(3):225–36. Los ejemplos no taxativos de los 5' UTR incluyen GmHsp (patente estadounidense Nro. 5.659.122); PhDnaK (patente estadounidense Nro. 5.362.865); AtAntI; TEV (Carrington y Freed (1990) J. Virol. 64:1590–7); y AGRtunos (GenBank Acceso Nro. V00087; y Bevan *et al.* (1983) Nature 304:184–7).

En algunas formas de realización, la región del promotor se deriva de los genes del cloroplasto, tal como el gen *psbA* de la espinaca o las arvejas, la región del promotor *rbcL* y *atpB* del maíz y los promotores rRNA (del operón *rrn* del plástido). Los ejemplos de los promotores se describen en Verma y Daniell (2007) Plant Physiol. 145: 1129–43; Rasala *et al.* (2011) Plant Biotech. J. 9: 674–83, Hanley–Bowdoin y Chua, TIBS (1987) 12:67–70; Mullet *et al.*, Plant Molec. Biol. (1985) 4:39–54; Hanley–Bowdoin (1986) PhD. Dissertation, The Rockefeller University; Krebbers *et al.*, Nucleic Acids Res. (1982) 10:4985–5002; Zurawski *et al.*, Nucleic Acids Res. (1981) 9:3251–3270; y Zurawski *et al.*, Proc. Nat'l Acad Sci. U.S.A. (1982) 79:7699–7703. Se pueden identificar otros promotores así como evaluar la fuerza relativa de los promotores al colocar un promotor de interés a 5' de un gen marcador sin promotor y observar su eficacia en relación con la transcripción que se obtiene, por ejemplo, del promotor del gen *psbA*, el promotor de cloroplastos más fuerte identificado hasta la fecha. La eficacia de la expresión de la región codificadora se puede mejorar además mediante una variedad de técnicas. Estas incluyen el uso de varios promotores en tándem insertados a 5' de la secuencia de ADN de interés, por ejemplo, un promotor *psbA* doble, el agregado de un potenciador y similares. En una forma de realización, la región de promotor se deriva de un gen de cloroplasto tal como se muestra en la Tabla 2 a continuación.

Plástidos del gen	Promotor	Producto	
<u>rps12</u>	Prps12	Traducción	proteína ribosomal S12
<u>psbA</u>	PpsbA	Fotosíntesis	proteína D1 del fotosistema II

<u>rps16</u>	Prps16	Traducción	proteína ribosomal S16
<u>psbK</u>	PpsbK	Fotosíntesis	proteína K del fotosistema II
<u>psbI</u>	PpsbI	Fotosíntesis	proteína I del fotosistema II
<u>atpA</u>	PatpA	Metabolismo de la energía	Subunidad alfa CF1 ATP sintasa
<u>atpF</u>	atpF	Metabolismo de la energía	Subunidad B CF0 ATP sintasa
<u>atpH</u>	atpH	Metabolismo de la energía	Subunidad C CF0 ATP sintasa
<u>atpI</u>	PatpI	Metabolismo de la energía	Subunidad A CF0 ATP sintasa
<u>rps2</u>	Prps2	Traducción	proteína ribosomal S2
<u>rpoC2</u>	PrpoC2	Transcripción	Subunidad beta" ARN polimerasa
<u>rpoC1</u>	PrpoC1	Transcripción	Subunidad beta' ARN polimerasa
<u>rpoB</u>	PrpoB	Transcripción	Subunidad beta ARN polimerasa
<u>petN</u>	PpetN	Metabolismo de la energía	citocromo b6/subunidad VIII complejo f
<u>psbM</u>	PpsbM	Fotosíntesis	proteína M del fotosistema II
<u>psbD</u>	PpsbD	Fotosíntesis	proteína D2 del fotosistema II
<u>psbC</u>	psbC	Fotosíntesis	proteína de 44 kDa del fotosistema II
<u>psbZ</u>	psbZ	Fotosíntesis	proteína Z del fotosistema II
<u>rps14</u>	rps14	Traducción	proteína ribosomal S14
<u>psaB</u>	psaB	Fotosíntesis	apoproteína A2 clorofila P700 del fotosistema I

<u>psaA</u>	psaA	Fotosíntesis	apoproteína A1 clorofila P700 del fotosistema I
<u>ycf3</u>	ycf3	Plástidos hipotéticos conservados	proteína de ensamblaje Ycf3 del fotosistema I
<u>rps4</u>	Prps4	Traducción	proteína ribosomal S4
<u>ndhJ</u>	ndhJ	Metabolismo de la energía	subunidad J de deshidrogenasa NADH
<u>ndhK</u>	ndhK	Metabolismo de la energía	subunidad K de deshidrogenasa NADH
<u>ndhC</u>	ndhC	Metabolismo de la energía	subunidad 3 de deshidrogenasa NADH
<u>atpE</u>	atpE	Metabolismo de la energía	subunidad épsilon CF1 ATP sintasa
<u>atpB</u>	PatpB	Metabolismo de la energía	subunidad beta CF1 ATP sintasa
<u>rbcL</u>	PrbcL	Fotosíntesis	subunidad larga de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
<u>accD</u>	PaccD	Metabolismo de los ácidos grasos	subunidad beta de acetil-CoA carboxilasa
<u>psal</u>	psal	Fotosíntesis	subunidad VIII fotosistema I
<u>ycf4</u>	ycf4	Plástidos hipotéticos conservados	proteína de ensamblaje Ycf4 del fotosistema I
<u>cemA</u>	cemA	Transportes	cobertura de proteína de membrana
<u>petA</u>	petA	Metabolismo de la	citocromo f

		energía	
<u>psbJ</u>	psbJ	Fotosíntesis	proteína J del fotosistema II
<u>psbL</u>	psbL	Fotosíntesis	proteína L del fotosistema II
<u>psbF</u>	psbF	Fotosíntesis	proteína VI del fotosistema II
<u>psbE</u>	psbE	Fotosíntesis	proteína V del fotosistema II
<u>petL</u>	petL	Metabolismo de la energía	subunidad VI del complejo citocromo b6/f
<u>petG</u>	petG	Metabolismo de la energía	subunidad V del complejo citocromo b6/f
<u>psaJ</u>	psaJ	Fotosíntesis	subunidad IX del fotosistema I
<u>rpl33</u>	rpl33	Traducción	proteína ribosomal L33
<u>rps18</u>	rps18	Traducción	proteína ribosomal S18
<u>rpl20</u>	rpl20	Traducción	proteína ribosomal L20
<u>clpP</u>	PclpP	Procesos celulares	subunidad proteolítica de proteasa Clp dependiente de ATP
<u>psbBn</u>	psbBn	Fotosíntesis	proteína de 47 kDa del fotosistema II
<u>psbT</u>	psbT	Fotosíntesis	proteína T del fotosistema II
<u>psbN</u>	psbN	Fotosíntesis	proteína N del fotosistema II
<u>psbH</u>	psbH	Fotosíntesis	proteína H del fotosistema II
<u>petB</u>	petB	Metabolismo de la energía	citocromo b6
<u>petD</u>	petD	Metabolismo de la energía	subunidad IV del complejo citocromo b6/f
<u>rpoA</u>	rpoA	Transcripción	subunidad alfa de ARN polimerasa
<u>rps11</u>	rps11	Traducción	proteína ribosomal S11

<u>rpl36</u>	Prpl36	Traducción	proteína ribosomal L36
<u>rps8</u>	Prps8	Traducción	proteína ribosomal S8
<u>rpl14</u>	Prpl14	Traducción	proteína ribosomal L14
<u>rpl16</u>	rpl16	Traducción	proteína ribosomal L16
<u>rps3</u>	rps3	Traducción	proteína ribosomal S3
<u>rpl22</u>	rpl22	Traducción	proteína ribosomal L22
<u>rps19</u>	rps19	Traducción	proteína ribosomal S19
<u>rpl2</u>	rpl2	Traducción	proteína ribosomal L2
<u>rpl23</u>	rpl23	Traducción	proteína ribosomal L23
<u>ycf2</u>	ycf2	Plástidos hipotéticos conservados	Ycf2
<u>ndhB</u>	ndhB	Metabolismo de la energía	subunidad 2 de deshidrogenasa NADH
<u>rps7</u>	rps7	Traducción	proteína ribosomal S7
<u>ndhF</u>	ndhF	Metabolismo de la energía	subunidad 5 de deshidrogenasa NADH
<u>rpl32</u>	rpl32	Traducción	proteína ribosomal L32
<u>ccsA</u>	PccsA	Biosíntesis de los cofactores	proteína del biogénesis del citocromo c
<u>ndhD</u>	PndhD	Metabolismo de la energía	subunidad 4 de deshidrogenasa NADH
<u>psaC</u>	psaC	Fotosíntesis	subunidad VII del fotosistema I
<u>ndhE</u>	PndhE	Metabolismo de la energía	subunidad 4L de deshidrogenasa NADH
<u>ndhG</u>	ndhG	Metabolismo de la energía	subunidad 6 de deshidrogenasa NADH
<u>ndhI</u>	ndhI	Metabolismo de la	subunidad I de

		energía	deshidrogenasa NADH
<u>ndhA</u>	ndhA	Metabolismo de la energía	subunidad 1 de deshidrogenasa NADH
<u>ndhH</u>	ndhH	Metabolismo de la energía	subunidad 7 de deshidrogenasa NADH
<u>rps15</u>	rps15	Traducción	proteína ribosomal S15
<u>ycf1</u>	Pycf1	Plástidos hipotéticos conservados	Ycf1
<u>rpl23</u>	rpl23	Traducción	proteína ribosomal L23
<u>rpl2</u>	rpl2	Traducción	proteína ribosomal L2
genes	PtrnY		
tARN	PtrnM		
	PtrnE		
	PtrnV		
operón	Prn		
ARN			

En su gran mayoría, los promotores funcionales en los cloroplastos son constitutivos más que inducibles. No obstante, cuando es deseable proporcionar la expresión inducible de la molécula de ARNdc de interés, se puede proporcionar un promotor regulable y/o una secuencia que contiene la región no traducible 5' (5' UTR) que proporcionan regulación en el nivel de la transcripción y/o la traducción (en el extremo de 3'). La transcripción y la estabilidad del ARN parecen ser determinantes de importancia en la expresión de los genes de cloroplastos. Por ejemplo, la región 5' no traducida se puede usar de un gen cuya expresión se regula con la luz. De la misma manera, las regiones de repetición invertida de 3' se podrían usar para estabilizar los genes

foráneos de ARN. Los genes regulables se pueden identificar mediante la expresión mejorada en respuesta a estímulos de interés particulares y expresión baja o ausente en ausencia de estímulos. Por ejemplo, se puede identificar un gen regulable por luz donde la expresión mejorada ocurre durante la irradiación con luz mientras que la expresión se reduce de forma considerable o la expresión de luz es despreciable. Las regiones no traducibles a 5' que se pueden usar de acuerdo con la invención incluyen GGAGG, psbA, rbcL, atpB, Cry2A y gen 10 de T7.

Secuencias de regulación adicional pueden funcionar unidas de manera opcional a una molécula de ácido nucleico de interés que incluye además una región no traducida 3' (3'UTR), regiones de terminación de transcripción 3' o regiones de poliadenilación. Estos son elementos genéricos ubicados cadena abajo de una secuencia de nucleótidos e incluyen polinucleótidos que proporcionan señales de poliadenilación y/u otras señales de regulación capaces de afectar la transcripción o el procesamiento de ARNm. Las funciones de señal de poliadenilación en plantas causan la adición de nucleótidos poliadenilados al extremo 3' del precursor de ARNm. La secuencia de poliadenilación se pueden derivar de una variedad de genes de planta o de genes de ADN-T. Un ejemplo no taxativo de la región de terminación de transcripción de 3' es la región 3' de nopalina sintasa (Nros 3'; Fraley *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803–7). Un ejemplo del uso de regiones no traducidas 3' se proporciona en Ingelbrecht *et al.*, (1989) Plant Cell 1:671–80. Los ejemplos no taxativos de las señales de poliadenilación incluyen señales de un gen RbcS2 de *Pisum sativum* (Ps.RbcS2–E9; Coruzzi *et al.* (1984) EMBO J. 3:1671–9) y AGRtu.nos (GenBank Acceso Nro. E01312). Las regiones no traducibles a 3' UTR que se pueden usar de acuerdo con la invención rps16, rbcL, psbA y petD.

En algunas formas de realización, el vector de transformación puede contener secuencias complementarias de manera específica a más de una

secuencia de objetivos, y en consecuencia permiten la producción de más de un ARNdc para inhibir la expresión de dos o más genes en células de una o más poblaciones o especies de organismos objetivo. Los segmentos de secuencias de nucleótidos que son complementarios específicos de las secuencias de nucleótidos presentes en genes diferentes se pueden combinar en una molécula compuesta de ácido nucleico para la expresión de una planta transgénica. Tales segmentos pueden estar contiguos o separados por una secuencia espaciadora.

Un constructo o vector de ácidos nucleicos de la presente invención puede comprender un marcador seleccionable que confiere un fenotipo seleccionable a una célula transformada. El marcador puede codificar resistencia biocida, resistencia antibiótica (por ejemplo, kanamicina, Geneticina (G418), bleomicina, higromicina, etc.), o tolerancia a herbicidas (por ejemplo, glifosato, etc.).

Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, a título enunciativo y no taxativo: un gen nuevo que codifica la resistencia a la kanamicina y se puede seleccionar para usar la kanamicina, G418, etc.; un gen barra que codifica la resistencia a bialafós; un gen de enolpiruvilsisquimatofosfatosintasa EPSP mutante que codifica la tolerancia al glifosato; un gen de nitrilasa que confiere resistencia a bromoxinilo; un gen de acetolactato sintasa (ALS) mutante que confiere resistencia a la imidazolinona o sulfonilurea; y un gen dihidro-folato-reductasa DHFR resistente al metotrexato. Los varios marcadores seleccionables están disponibles para proporcionar resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina, espectinomina, rifampicina, estreptomicina y tetraciclina y similares. Los ejemplos de marcadores seleccionables se ilustran en, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nros. 5.550.318; 5.633.435; 5.780.708; y 6.118.047.

Un constructo o vector de ácido nucleico recombinante de la presente invención también se puede incluir como marcador detectable. Los marcadores detectables se pueden usar para supervisar la expresión. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen β -glucuronidasa o gen uidA (GUS) que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos (Jefferson *et al.* (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387–405); un locus del gen R que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos vegetales (Dellaporta *et al.* (1988) "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon tagging with Ac." En 18th Stadler Genetics Symposium. P. Gustafson and R. Appels, eds. (New York: Plenum), pp. 263–82); a β -lactamase gene (Sutcliffe *et al.* (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737–41); un gen que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen de luciferasa (Ow *et al.* (1986) *Science* 234:856–9); un gen xyle que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir catecol 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 tirosina que codifica una enzima capaz de oxidar la tirosina a DOPA y dopaquinona que a su vez se condensan en melanina (Katz *et al.* (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:2703–14); y una alfa-galactosidasa.

En una forma de realización, el constructo de ácido nucleico puede incluir una región de codificación para producir un polipéptido insecticida.

El polipéptido insecticida puede ser un insecticida para una plaga de coleópteros, lepidópteros o hemípteros.

El polipéptido insecticida puede ser uno que tenga una secuencia de polipéptidos que se encuentran en *Bacillus thuringiensis*.

Un insecticida de polipéptido *B. thuringiensis* se puede seleccionar del grupo que consiste de lo siguiente: Cry1 (por ejemplo, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ca, Cry1Da), Cry2 (por ejemplo, Cry2Ab), Cry3 (por ejemplo,

Cry3Bb; Cry3A), Cry6, Vip3 (por ejemplo, Vip3Ab1), Cry34, Cry35 y modificaciones de ellos que incluyen, a título enunciativo y no taxativos, adiciones y eliminaciones. Una lista extensa de los *Bts* se mantiene y se actualiza con regularidad en: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html. En la actualidad hay más de 73 grupos principales de toxinas "Cry" (Cry1–Cry73), con más de toxinas Cyt adicionales y toxinas de proteínas insecticidas vegetales (VIP) y similares. Muchos de los grupos numéricos tienen subgrupos en mayúsculas y los subgrupos con letras en mayúsculas tienen subgrupos en minúsculas. (Cry1 tiene A–L y Cry1A tiene a–i, por ejemplo).

El polipéptido insecticida puede ser un polipéptido PIP–1.

En una forma de realización, un polipéptido insecticida *B. thuringiensis* se puede usar con un constructo que contiene ARNdc que es insecticida para un gen esencial de CPB (escarabajo de la papa de Colorado), gusano de la raíz del maíz u otras plagas de insectos. Tales genes objetivo incluyen, por ejemplo, genes de codificación de base de ATP en CPB. Otros genes objetivo similares incluyen, por ejemplo, la ATPasa vacuolar, ARF–1, Act42A, CHD3, EF–1a, ROP, RNAPII y TFIIB en el gusano del maíz. Un ejemplo de un gen objetivo adecuado es la ATPasa vacuolar, tal como se divulga en la patente internacional WO2007035650.

En algunas formas de realización, los constructos de ácido nucleico recombinantes, tal como se describen *ut supra*, se pueden usar en métodos para la creación de plantas transgénicas y la expresión de ácidos nucleicos heterólogos específicos para los plásmidos de las plantas para permitir la producción de niveles en estado estacionario de moléculas de nivel estacionario de ARNdc. La transformación de los vectores de plantas se puede preparar, por ejemplo, por la inserción de constructos de ácido nucleico que codifican moléculas de ARNdc en vectores de transformación de plantas, en

particular los vectores de transformación de plástidos e introducirlos en los plástidos (por ejemplo, los cloroplastos).

Donde se desea obtener la replicación de un plásmido que contiene el casete de expresión en el cloroplasto de cualquier cloroplasto de origen de replicación se pueden usar en el constructo de expresión.

En una forma de realización, el constructo de ácido nucleico está adaptado para prevenir la expresión del ARN_{dc} producido a partir de él en el núcleo de la célula huésped u otro compartimiento de la célula huésped donde el ARN_{pi} se puede producir a partir el ARN_{dc}. Esto permite la producción del material de la planta que contiene el ARN_{dc} insecticida que no está contaminado por ARN_{pi} derivado del insecticida ni asociado a proteínas de Argonauta y, por ende, mejoró su potencia insecticida. De acuerdo con esta forma de realización se proporciona un constructo de ácido nucleico para la transformación de una planta vascular que comprende lo siguiente:

- una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARN_{dc});
- un promotor que funciona en un plástido que permite la producción de una molécula de ARN_{dc} en un plástido, de preferencia seleccionado entre un elemento promotor o un elemento regulador que se muestra en la Tabla 2;
- uno o más sitios selectivos de integración de constructos en el genoma plástido de una planta vascular; de preferencia seleccionada del grupo siguiente de sitios de integración: trnH/pbA, trnG/trnfM, ycf3/trnS, rbcL/accD, petA/psbJ, 5'rps12/clpP, petD/rpoA, ndhB/rps7, 3'rps12/trnV, trnV/rrn16, rrn16/trnI, trnI/trnA, trnN/trnR y rpl32/trnL.

De acuerdo con la presente forma de realización, el uso del promotor que sólo se activa en el cloroplasto y el uso de los sitios de integración que permiten la integración sólo del genoma del cloroplasto impide la formación de plantas que expresan el ARN_{dc} del transgen relevante fuera del cloroplasto e

impiden la formación de plantas que expresan el ARN_{dc} del transgen relevante fuera del cloroplasto e impide la formación de plantas que expresan el ARN_{pi} del genoma relevante. Una ventaja es que uno puede seleccionar los transformantes sobre la base de la presencia de una transformación de cloroplastos sin tener que seleccionar otras células que fueran plástidos o transformantes nucleares porque esta población última de células no está creada para el uso en contrastes.

En especial, en una forma de realización preferida existe un constructo de ácido nucleico para la transformación de una planta vascular, que comprende lo siguiente:

- una región de codificación para codificar una molécula de ARM que tiene una primera y una segunda regiones de ARN separadas por una región espaciadora donde la primera región codificadora tiene una secuencia de complementariedad primera o segunda y donde la región espaciadora es idéntica u homóloga a una secuencia de intrón que se muestra en la Tabla 1;
- un promotor que funciona en un plástido que permite la producción de una molécula de ARN en un plástido, de preferencia seleccionado entre un promotor seleccionado de un promotor o un elemento regulador que se muestra en la Tabla 2;
- uno o más sitios selectivos de integración de constructos en el genoma plástido de una planta vascular; de preferencia seleccionada del grupo siguiente de sitios de integración: trnH/pbA, trnG/trnfM, ycf3/trnS, rbcL/accD, petA/psbJ, 5'rps12/clpP, petD/rpoA, ndhB/rps7, 3'rps12/trnV, trnV/rn16, rn16/trnI, trnI/trnA, trnN/trnR y rpl32/trnL.

C. Transformación de plástidos

Los constructos de ácido nucleico de la invención se pueden transformar en una célula de planta de interés mediante cualquiera de varios métodos.

Estos métodos incluyen, por ejemplo, dispositivos biolísticos (véase, por ejemplo, Sanford, Trends In Biotech. (1988) 6:299–302; patente de EE.UU. Nro. 4.945.050); electroporación (Fromm *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) (1985) 82:5824–5828); uso de un haz de láser, electroporación, microinyección o cualquier otro método capaz de introducir ADN en un cloroplasto. El uso de estas técnicas permite la aplicación de la invención descrita en la presente en una amplia variedad de células de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Según se usa en la presente, el término "transformación" o "transducción" se refiere a la transferencia de una o varias moléculas de ácido nucleico en una célula. Una célula es "transformada" por una molécula de ácido nucleico transducida en la célula cuando la molécula de ácido nucleico se torna establemente replicada por la célula, ya sea por incorporación de la molécula de ácido nucleico en el genoma celular o por replicación episómica. Según se usa en la presente, el término "transformación" abarca todas las técnicas mediante las cuales una molécula de ácido nucleico se puede introducir en dicha célula. Los ejemplos incluyen, aunque no a modo de limitación: transfección con vectores virales; transformación con vectores plásmidos; electroporación (Fromm *et al.* (1986) Nature 319:791–3); lipofección (Feigner *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413–7); microinyección (Mueller *et al.* (1978) Cell 15:579–85); transferencia mediada por *Agrobacterium* (Fraley *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803–7); captación directa de ADN; y bombardeo de microproyectiles (Klein *et al.* (1987) Nature 327:70).

Para usar en la técnica de transformación por bombardeo, un constructo de ácido nucleico es adsorbido en una partícula de bombardeo, que típicamente consiste en una partícula de tungsteno con un tamaño promedio de aproximadamente 0,7 μm . Las partículas que consisten en otros metales con una densidad similar a la del tungsteno también pueden ser útiles, tales como oro, platino y similares. Típicamente, alrededor de 2–5 μg de ADN es adsorbido por μg de tungsteno, usualmente alrededor de 2 μg de ADN por μg de

tungsteno. Luego de la adsorción del ADN en las partículas, cualquier masa de partículas se dispersa, por ejemplo, por sonicación. Cualquier método para fijar el ADN sobre la superficie exterior de las partículas de bombardeo de metal es aceptable y conocido para el especialista en el arte (véase, por ejemplo, Sanford *et al.* (1988) *supra* y Klein *et al.* *supra*). El ADN se debe asegurar en las partículas para su administración, pero no se debe fijar de manera tal de impedir la liberación del ADN en las célula.

Para la transformación, alrededor de 100–500 µg, en general aproximadamente 200 µg de partículas de bombardeo en las cuales se ha adsorbido el casete de expresión se cargan en una pistola de partículas (tal como aquellas disponibles de Biolistics, Inc. y DuPont), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células aisladas, generalmente 100–300 µg de peso fresco por placa Petri (de 5 cm de diámetro), se colocan sobre una superficie de crecimiento, tal como una placa Petri o recipiente de cultivo tisular que contiene, por ejemplo, papel de filtro Whatman Nro. 1 con medio de crecimiento para adherir las células a una superficie sólida. Las células no necesitan estar en una única capa celular, sino que pueden tener varias capas de espesor. Las células inmovilizadas se colocan en la cámara de bombardeo de la pistola de partículas y se ubican bajo el mayor vacío posible, por lo general de aproximadamente 0,07 a 0,3 atmósferas, preferentemente 0,07. La presión de la cámara de muestras luego se reduce a aproximadamente 0,07 atmósferas antes del bombardeo. Las células preferentemente se bombardean a aproximadamente 10 cm desde el extremo del tambor de la pistola de partículas (en el nivel cuatro de la pistola de genes DuPont). El mecanismo de disparo de la pistola de partículas se activa, y las células son bombardeadas de 1–3 veces, generalmente 2 veces, para aumentar el número de células transformadas. El vacío luego es liberado, y las células bombardeadas se colocan en medio de crecimiento fresco a aproximadamente 26°C, preferentemente a la luz, en cámaras de crecimiento. Otros dispositivos

bolísticos incluyen el uso de “discos voladores”, tales como aquellos hechos de membranas de plástico o discos hechos de, por ejemplo, malla de nailon (94 μm) (método de “arrastre de helio”).

Una planta que contiene plástidos transgénicos (por ejemplo, cloroplastos) se puede generar cuando la célula huésped usada en el proceso de transformación posee totipotencialidad. Los procedimientos para la regeneración de plantas transgénicas a partir de células o tejidos transformados son, en general, similares, con modificaciones adecuadas dentro de la capacidad del especialista en el arte. La regeneración de plantas dicotiledóneas tales como remolachas azucareras, Freytag *et al.* Plant Cell Rep. (1988) 7:30–34; tabaco, Svab *et al.* Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. (1990) 85:26–30, o monocotiledóneas tales como trigo a partir de anteras o embriones (véase a continuación) ha tenido éxito de rutina.

Si se desea transformar plástidos en otros materiales de plantas, por ejemplo en plantas derivadas de cultivo de anteras o en callos derivados de embriones, el material de planta se coloca en un recipiente conveniente, por ejemplo una placa Petri, como se describió antes para células aisladas (véase también US 6.680.426; Hanson *et al.* (2012) Journal of Experimental Botany, 64: 753–768; y Golds *et al.*, (1993) Nature Biotechnology 11, 95–97).

Una vez que el plástido ha demostrado haberse transformado, las células de la planta se pueden usar repetidamente para cultivo tisular, seguido por el desarrollo de un tejido de callo cuando se desea o la regeneración de una planta. Así, la célula de planta modificada se puede regenerar repetidamente mediante el uso de cultivo celular y tisular. En algunas instancias, se puede mantener una adecuada propagación a partir de la semilla. A fin de mejorar la capacidad para identificar células transformadas, se puede querer emplear un gen marcador seleccionable o detectable, como se estableció previamente, con el vector de transformación usado para generar el transformante. En caso de usar un marcador seleccionable, las células

transformadas se identifican dentro de la población celular potencialmente transformada exponiendo a las células a un agente o a varios agentes selectivos. En caso de usar un marcador detectable, las células se pueden analizar para detectar el rasgo de gen marcador deseado.

Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o las células que han dado positivo en un ensayo de selección, se pueden cultivar en medios que soportan la regeneración de plantas. En algunas formas de realización, cualquier medio de cultivo tisular de planta adecuado (por ejemplo, medios MS y N6) se puede modificar incluyendo otras sustancias, tales como reguladores del crecimiento. El tejido se puede mantener en un medio básico con reguladores de crecimiento, hasta que se dispone de suficiente tejido para comenzar los esfuerzos de regeneración de plantas, o luego de repetidas rondas de selección manual, hasta que la morfología del tejido es adecuada para la regeneración (por ejemplo, al menos 2 semanas), y luego transferir a medias que conduzcan a la formación de brotes. Los cultivos se transfieren periódicamente hasta que se ha producido suficiente formación de brotes. Una vez que se forman los brotes, se transfieren a medios que conduzcan a la formación de raíces. Una vez que se forman suficientes raíces, las plantas se pueden transferir a la tierra para su ulterior crecimiento y maduración.

Para confirmar la presencia de una molécula de ARN_{dc} en las plantas en regeneración, se puede realizar una variedad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo: ensayos de biología molecular, tales como Southern y Northern blotting, PCR, y secuenciación de ácido nucleico; ensayos de partes de plantas, tales como ensayos de hojas o raíces.

Según el enfoque de transformación, los transformantes pueden incluir células que son transformantes tanto plástidos como nucleares, de modo que la selección de un marcador vinculado con la transformación de plástido pueda también dar por resultado la selección de células que son transformantes tanto plástidos como nucleares, lo cual potencialmente resulta en células que

podrían expresar ARNdc y/o formar ARNsi fuera del cloroplasto, lo que podría tener impacto sobre la potencia insecticida de una planta generada por estas células. Este problema se puede tratar utilizando un constructo preferido de la invención descrito antes, que contiene regiones de recombinación homólogas (también descritas en la presente como sitios de integración), que permiten la integración en el genoma plástido, pero no en el genoma nuclear, y el uso de un promotor que es activo en los cloroplastos únicamente. Esto permite al método de selección seleccionar células o plantas que producen ARNdc en pláستidos y que no producen ARNdc fuera de los pláستidos, o ARNsi.

Los eventos de integración se pueden analizar, por ejemplo, por amplificación de PCR usado, por ejemplo, cebadores oligonucleótidos específicos para una molécula de ácido nucleico o ARNdc de interés. Se entiende que la genotipificación por PCR incluye, aunque no a modo de limitación, amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) de ADN genómico derivado de tejido de callo de plantas huésped aisladas que se predice que contiene una molécula de ácido nucleico de interés integrada en el genoma, seguida por clonación estándar y análisis de secuencia de productos de amplificación de PCR. Los métodos de genotipificación por PCR han sido bien descritos (por ejemplo, Rios, Q. *et al.* (2002) *Plant J.* 32:243–53) y se pueden aplicar a ADN genómico derivado de cualquier especie de planta (por ejemplo, *Z. mays* o *G. max*) o tipo de tejido, incluidos cultivos celulares.

En formas de realización particulares, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, o más moléculas de ARNdc diferentes son producidas en una célula de planta. Las moléculas de ARNdc se pueden expresar a partir de múltiples constructos de ácido nucleico introducidos en diferentes eventos de transformación, o a partir de un solo constructo de ácido nucleico introducido en un solo evento de transformación. En algunas formas de realización, una pluralidad de moléculas de ARNdc se expresan bajo el control de un solo promotor. En otras formas de realización, una pluralidad de moléculas de ARNdc se expresan bajo el control

de múltiples promotores. Se pueden expresar moléculas de ARNdc únicas que comprenden múltiples secuencias de ácido nucleico que son, cada una, homólogas a diferentes loci dentro de uno o varios organismos que tienen secuencias génicas blanco.

Además de la transformación directa de una planta con un constructo de ácido nucleico, se pueden preparar plantas transgénicas cruzando una cebadora planta que tiene al menos un evento transgénico con una segunda planta que carece de dicho evento. Por ejemplo, un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARNdc se puede introducir en una cebadora línea de planta que es susceptible de transformación para producir una planta transgénica, donde la planta transgénica se puede cruzar con una segunda línea de planta para lograr la introgresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de ARNdc en el entorno genético de la segunda línea de planta.

Cualquiera de varias plantas vasculares se puede transformar de acuerdo con los métodos anteriores.

Los plástidos también se pueden transformar con constructos insecticidas que apuntan a la misma vía de acción biológica o a vías diferentes en la plaga que el ARNdc producido por los plástidos y constructos de ácido nucleico de la invención. Los ejemplos de estos constructos incluyen aquellos que codifican proteínas insecticidas como se mencionó *supra*, en especial proteínas insecticidas de *B. thuringiensis*, preferentemente proteínas Cry. La región codificadora relevante de estos constructos se puede proporcionar en los constructos de ácido nucleico de la invención (es decir, aquellos que producen ARNdc), o pueden estar en constructos separados. Respecto de esto último, por ejemplo, en una forma de realización, el plástido puede incluir un cebador constructo de ácido nucleico que incluye:

- una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);

- un promotor operable en un plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc en un plástido;
- uno o varios sitios de integración selectivos para la integración del constructo en un genoma de plástido de una planta vascular;
- en donde el ARNdc tiene una secuencia que permite la producción de ARNsi a partir de allí; y

otro constructo de ácido nucleico que incluye:

una región codificadora para codificar un agente insecticida, preferentemente una proteína insecticida.

En una forma de realización, el plástido tiene más de 2 constructos de ácido nucleico diferentes, uno de los cuales es el constructo de ácido nucleico para codificar o producir ARNdc insecticida como se divulga en la presente. En otras formas de realización, el plástido tiene más de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más constructos diferentes, al menos uno de los cuales es el ácido nucleico para codificar o producir ARNdc insecticida como se divulga en la presente.

C. Plantas

Las plantas vasculares también se conocen como traqueófitas, y además como plantas superiores. Las plantas vasculares son plantas de tierra que tienen tejidos lignificados (el xilema) para conducir el agua y los minerales por toda la planta. También tienen un tejido no lignificado especializado (el líber) para conducir los productos de la fotosíntesis. Por consiguiente, la planta de la presente invención puede ser una planta seleccionada del grupo que consiste en lipocodios, colas de caballo, helechos, gimnospermas (incluidas coníferas) y angiospermas (plantas de flores), y plantas del grupo de Tracheophyta y Tracheobionta.

En una forma de realización preferida, la planta es un dicotiledónea seleccionada del grupo que consiste en: canola, algodón, papa, quínoa, amaranto, alforfón, cártamo, soja, remolacha azucarera, girasol, colza, tabaco,

Arabidopsis, especies de *Brassica* (por ejemplo, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*, *B. carinata*, *B. nigra*, *B. oleracea*, *B. alba*, etc.), algodón, alfalfa y trébol.

En una forma de realización preferida, la planta es una monocotiledónea seleccionada del grupo que consiste en: maíz, arroz, centeno, sorgo, mijo, trigo, caña de azúcar, centeno, cebada, piña, banana, palmito, ornamentales y pastos (por ejemplo, *Brachiaria*, *Lolium* y festuca).

Así, en otra forma de realización, la presente invención proporciona una planta que contiene un plástido que comprende:

- un constructo de ácido nucleico que incluye:
 - una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);
 - un promotor operable en el plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc;
- en donde el ARNdc tiene una secuencia que permite la producción de ARNsi a partir de allí.

En incluso otra forma de realización, la presente invención proporciona una planta que contiene un constructo de ácido nucleico para la transformación de una planta vascular, que comprende:

- una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);
- un promotor operable en un plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc en un plástido;
- uno o varios sitios de integración selectivos para la integración del constructo en el genoma del plástido de una planta vascular;
- en donde el ARNdc tiene una secuencia que permite la producción de ARNsi a partir de allí.

En una forma de realización preferida, una planta puede no contener ARNsi para hibridar al ARNdc codificado por el constructo de ácido nucleico. En otra forma de realización preferida, una planta puede no contener ARNdc

codificado por el constructo de ácido nucleico en un compartimiento distinto de un plástido. En estas formas de realización, la planta puede contener ARNdc en un plástido de la planta, pero no contiene ARNsi derivado de o de lo contrario con homología de secuencia o complementariedad con el ARNdc producido por el constructo de ácido nucleico en otra organela, citosol, núcleo u otra parte de la planta.

Se entenderá que, aunque las plantas de la invención generalmente no contienen ARNsi derivado de o de lo contrario con homología de secuencia o complementariedad con el ARNdc producido por el constructo de ácido nucleico, ni ARNdc fuera del cloroplasto que tiene homología de secuencia o complementariedad con el ARNdc producido por el constructo de ácido nucleico dentro del cloroplasto, en una forma de realización, las plantas de la invención pueden tener ARNdc o ARNsi que no tiene homología de secuencia o complementariedad con el ARNdc producido por el constructo de ácido nucleico dentro del cloroplasto. En esta forma de realización, una planta de acuerdo con la invención puede incluir además un evento de transformación nuclear que permite la producción o expresión de ARNdc o ARNsi en el núcleo de la planta, siempre que el ARNdc o ARNsi no tenga homología de secuencia o complementariedad con el del ARNdc producido dentro del cloroplasto. En un ejemplo, una planta se puede modificar adicionalmente por ingeniería genética para proporcionar silenciación génica, con lo cual se forma un rasgo agrónomo deseable o una propiedad insecticida. Esto último puede surgir de la formación de un ARNsi que causa la producción de un compuesto insecticida por parte de la planta.

En una forma de realización, la planta puede incluir organelas celulares distintas de un cloroplasto o plástido, que contienen un constructo de ácido nucleico para codificar un agente insecticida, tal como ARN o proteína, o el agente insecticida mismo. En una forma de realización, el núcleo o citoplasma contiene al menos un constructo de ácido nucleico para codificar un agente

insecticida, tal como ARN o proteína, o el agente insecticida mismo, preferentemente más de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más constructos diferentes o productos génicos codificados por los constructos.

Una planta de la invención puede ser heteroplásmica para el constructo de ácido nucleico de algunas formas de realización de la invención, donde sólo una fracción del número total de cloroplastos de cada célula se transforman, u homoplásmica, donde la mayor parte o todos los cloroplastos de cada célula se transforman. Preferentemente, la planta es homoplásmica. Más preferentemente, la planta es de una generación post T1 y es homoplásmica.

Las plantas de la invención pueden incluir una mutación en el gen que codifica un producto génico requerido para el funcionamiento de la vía del ARNi. Un ejemplo de dicho producto génico es similar DICER 4. Otros incluyen DRB4 y sus ortólogos. Estas plantas se pueden generar proporcionando células de plantas o tejido vegetal que contiene la mutación (por ejemplo, una mutación que resulta de la recombinación *knock out* u homóloga) y transformar esas células con un constructo de ácido nucleico de las formas de realización de la invención descritas en la presente. Alternativamente, una planta transformada con un constructo de ácido nucleico de las formas de realización de la invención descritas en la presente se puede cruzar con una planta que tiene una mutación en un gen que codifica un producto génico requerido para el funcionamiento de la vía de ARNi.

Las plantas de la invención también pueden incluir un gen que codifica tolerancia a un herbicida, tal como un herbicida que contiene ácido carboxílico, incluida una fenoxi auxina.

En una forma de realización, la invención proporciona una semilla, corte u otro material vegetal derivado de o de lo contrario obtenido de una planta de acuerdo con la invención, en especial una planta que contiene un plástido que comprende:

- un constructo de ácido nucleico que incluye:

- una región codificadora para codificar una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc);
- un promotor operable en el plástido para permitir la producción de la molécula de ARNdc;
- en donde el ARNdc tiene una secuencia que permite la producción de ARNsi a partir de allí.

Una semilla como se describió antes puede contener ARNdc insecticida, y puede contener el constructo de ácido nucleico que contiene la región codificadora y el promotor descritos antes. Alternativamente, la semilla puede no contener ARNdc insecticida (por ejemplo, debido a que el promotor no está activado en la semilla) y puede contener simplemente el constructo de ácido nucleico que contiene la región codificadora y el promotor descritos antes, el cual luego puede ser activado para formar ARNdc insecticida en el plástido o cloroplasto, por ejemplo cuando la semilla germina y/o produce follaje.

La semilla se puede recubrir, y en una forma, la semilla se puede recubrir con ARN insecticida, incluyendo cualquier forma de ARN silenciador, preferentemente ARNdc. Otros recubrimientos pueden incluir otros insecticidas, incluidas proteínas o químicos insecticidas conocidos en el arte.

En otras formas de realización, se proporciona un producto básico producido por una planta de acuerdo con las formas de realización descritas antes.

D. Composiciones insecticidas

La invención además se refiere a la utilización de material derivado de plantas de acuerdo con la invención, preferentemente plantas que son homoplásmicas para la producción de ARNdc insecticida en cloroplastos o plástidos relacionados. Estos materiales se pueden proporcionar en grados de pureza particulares con respecto al ARNdc insecticida producido en los plástidos o cloroplastos de las plantas de la invención.

En algunas formas de realización, el material puede ser material de planta procesado que se ha sometido a tratamiento físico simple (por ejemplo, picado, corte, molido) en lugar de a tratamiento química.

En otras formas de realización, el material se puede haber sometido a tratamiento químico, por ejemplo para extraer y/o separar y/o preservar uno o varios componentes del material.

Más aún, el material se puede proporcionar en forma de un cultivo celular vivo.

En ciertas formas de realización, estos materiales se pueden utilizar como composición insecticida en una o varias aplicaciones, que incluyen el recubrimiento de semillas para recubrir semillas, incluyendo semillas que no han sido transformadas con ARNdc insecticida.

En otra forma de realización, el material se puede usar como carnada insecticida. Una carnada puede atraer una plaga o evitar que una plaga ingrese en una ubicación en particular.

Las composiciones insecticidas pueden adoptar la forma de un líquido pulverizable para pulverizar semillas, plantas o cultivos, o un sólido tal como un polvo, gránulo, pellet o similar.

E. Métodos

En una forma de realización, se proporciona un método para controlar plagas de insectos, que comprende presentar o proporcionar a dichas plagas o al medioambiente de dichas plagas una planta que incluye un plástido o constructo de ácido nucleico descrito antes. Típicamente, el ARNdc contenido en los cloroplastos o plástidos de la planta funciona tras el contacto con la plaga o el insecto, preferentemente con el contacto con el tracto gastrointestinal de la plaga o el insecto, para inhibir una función biológica en la plaga o el insecto, o para invocar una vía de ARNi en la plaga o el insecto que da por resultado la interferencia en la función de un gen esencial del insecto o la

plaga. Preferentemente, el medioambiente en el cual se requiere el control de las plagas de insectos es un cultivo o campo de plantas.

Típicamente, el control de las plagas de insectos hace que la población de la plaga se reduzca con respecto a una población de plaga en un medioambiente que no contiene plantas que tiene el ácido nucleico o los plástidos de la invención.

En una forma de realización, el control de plagas da por resultado la inhibición o minimización del crecimiento de las plagas de insectos, con respecto a una población de plaga que no ha consumido una planta que tiene el constructo de ácido nucleico o plástido de la invención. En esta forma de realización, las plagas pueden o no ser destruidas por su consumo de la planta que tiene el constructo de ácido nucleico o plástido de la invención. En esta forma de realización, la inhibición o minimización del crecimiento de plagas de insectos puede dar por resultado la minimización del daño al cultivo, y puede proporcionar un mejor rendimiento.

En ciertas formas de realización, las plantas y plástidos de la invención y el ARNdc que los contiene son insecticidas en el grado en que inducen la muerte, y/o reducen la tasa de crecimiento y/o reducen la fecundidad.

El cultivo o el campo de plantas puede consistir en plantas que incluyen un plástido o constructo de ácido nucleico como se describió antes, o puede incluir estas plantas y no contener plantas de refugio de transformante de cloroplasto en forma de plantas que no contienen un plástido o constructo de ácido nucleico como se describió antes. Cuando el cultivo o campo no contiene plantas de refugio de transformante de cloroplasto, preferentemente el cultivo o campo contiene menos del 30%, preferentemente menos del 20%, preferentemente menos del 10%, más preferentemente menos del 5% de plantas que no son plantas de refugio de transformante de cloroplasto.

Preferentemente, el control de estas plagas da por resultado la minimización o reducción del daño a hojas, raíces, tejidos reproductivos o

follaje de las plantas. Preferentemente, la reducción del daño es de al menos 50%, preferentemente 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o mayor al 95% de aquel observado en un control no transformado. De esta forma, la invención proporciona un método para mejorar el rendimiento de un cultivo o campo de plantas, que comprende presentar a las plagas o patógenos en el cultivo o campo una planta que incluye un plástido o constructo de ácido nucleico descrito antes, preferentemente para reducir el daño de la planta o parte de ella por la plaga o el patógeno.

En otra forma de realización, se proporciona un método para mejorar el rendimiento de un cultivo, que incluye:

proporcionar una planta o material de propagación de ella que incluye un constructo de ácido nucleico o plástido de acuerdo con la invención;

cultivar la planta para permitir la expresión del constructo de ácido nucleico en la planta cultivada, en donde la expresión del producto de ácido nucleico, con lo que se forma el ARNdc, inhibe la viabilidad o el crecimiento de la plaga en o sobre la planta.

En una forma de realización, se proporciona un método para controlar plagas de insectos, o prevenir la infestación o el daño causado por plagas de insectos, o matar plagas de insectos en el maíz, que comprende presentar a dichas plagas una planta de maíz que incluye un plástido o constructo de ácido nucleico descrito antes. Preferentemente, la plaga de insectos se selecciona de la siguiente tabla.

Maíz:

Lepidópteros	Coleópteros
<i>Agromyza parvicornis</i> , minador de las hojas del maíz	<i>Chaetocnema pulicaria</i> , escarabajo pulga del maíz
<i>Agrotis ipsilon</i> , gusano cortador grasiento	<i>Diabrotica longicornis barberi</i> , gusano de la raíz del maíz del norte
<i>Diatraea grandiosella</i> , taladro del maíz	<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> ,

del sudoeste	gusano de la raíz del maíz del sur
<i>Diatraea saccharalis</i> , taladro de la caña de azúcar	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> LeConte, gusano de la raíz del maíz del este
<i>Elasmopalpus lignosellus</i> , taladro del tallo del maíz menor	<i>Cyclocephala borealis</i> , escarabajo enmascarado del norte (gusano blanco)
<i>Helicoverpa zea</i> , gusano del maíz	<i>Cyclocephala immaculata</i> , escarabajo enmascarado del sur (gusano blanco)
<i>Ostrinia nubilalis</i> , taladro del maíz europeo	<i>Melanotus</i> spp., gusano de alambre <i>Agroites mancus</i> , gusano de alambre del calor <i>Limonijs agonus</i> , gusano de alambre del campo del este
<i>Spodoptera frugiperda</i> , gusano cogollero de otoño	<i>Popillia japonica</i> , escarabajo japonés
<i>Papaipema nebris</i> , taladro del tallo	<i>Sphenophorus maidis</i> , picudo del maíz <i>Sphenophorus aequalis aequalis</i> , (picudo) zarapito (picudo)
	Escarabajo de la hoja del maíz del sur
	Escarabajo de la semilla del maíz
Otros	
<i>Melanoplus sanguinipes</i> , saltamontes migratorio	<i>Anaphothrips obscurus</i> , trips del pasto
<i>Melanoplus femurrubrum</i> , saltamontes pata roja	<i>Anuraphis maidiradicis</i> , áfido de la raíz del maíz
<i>Rhopalosiphum maidis</i> , áfido de la hoja del maíz	<i>Blissus leucopterus</i> , chinche

<i>Solenopsis milesta</i> , hormiga ladrona	<i>Hylemya platura</i> , <i>Delia platura</i> , gusano de la semilla del maíz
<i>Tetranychus urticae</i> , ácaro araña de dos manchas	<i>Colaspis brunnea</i> , colaspis de la vid
<i>Crambus caliginosellus</i> , gusano en red de la raíz del maíz	
<i>Crambus teterrellus</i> , gusano en red del bluegrass	

En otra forma de realización, se proporciona un método para controlar plagas de insectos, o prevenir la infestación o el daño causado por plagas de insectos, o matar plagas de insectos en el sorgo, que comprende presentar a dichas plagas una planta de sorgo que incluye un plástido o constructo de ácido nucleico descrito antes. Preferentemente, la plaga de insectos se selecciona de la siguiente tabla.

Sorgo:

Lepidópteros	Coleópteros
<i>Chilo partellus</i> , taladro del sorgo	<i>Phyllophaga crinita</i> , gusano blanco
<i>Helicoverpa zea</i> , gusano del maíz	<i>Eleodes</i> , <i>Conoderus</i> , y <i>Aeolus</i> spp., gusanos de alambre
<i>Feltia subterranea</i> , gusano cortador granulado	<i>Oulema melanopus</i> , escarabajo de la hoja del cereal
<i>Elasmopalpus lignosellus</i> , taladro del tallo del maíz menor	<i>Sphenophorus maidis</i> , picudo del maíz
<i>Spodoptera frugiperda</i> , gusano cogollero de otoño	<i>Chaetocnema pulicaria</i> , escarabajo pulga del maíz
Otros	

<i>Blissus leucopterus leucopterus</i> , chinche	<i>Contarinia sorghicola</i> , mosquito del sorgo
<i>Tetranychus cinnabarinus</i> , ácaro araña de carmín	<i>Tetranychus urticae</i> , ácaro araña de dos manchas
<i>Rhopalosiphum maidis</i> , áfido de la hoja del maíz	<i>Sipha flava</i> , áfido de la caña de azúcar amarillo

En una forma de realización, se proporciona un método para controlar plagas de insectos, o prevenir la infestación o el daño causado por plagas de insectos, o matar plagas de insectos en el girasol, que comprende presentar a dichas plagas una planta de girasol que incluye un plástido o constructo de ácido nucleico descrito antes. Preferentemente, la plaga de insectos se selecciona de la siguiente tabla.

Girasol:

Lepidópteros	Coleópteros
<i>Suleima helianthana</i> , polilla de la yema del girasol	<i>Zygogramma exclamationis</i> , escarabajo del girasol
<i>Homoeosoma electellum</i> , polilla del girasol	<i>Bothyrus gibbosus</i> , escarabajo de la zanahoria
Otros	
<i>Neolasioptera murtfeldtiana</i> , mosquito de la semilla del girasol	

En otra forma de realización, se proporciona un método para controlar plagas de insectos, o prevenir la infestación o el daño causado por plagas de insectos, o matar plagas de insectos en el arroz, que comprende presentar a dichas plagas una planta de arroz que incluye un plástido o constructo de ácido

nucleico descrito antes. Preferentemente, la plaga de insectos se selecciona de la siguiente tabla.

Arroz:

Lepidópteros	Coleópteros
<i>Diatraea saccharalis</i> , taladro de la caña de azúcar	<i>Lissorhoptrus oryzophilus</i> , gorgojo del agua de arroz
<i>Helicoverpa zea</i> , gusano del maíz	<i>Sitophilus oryzae</i> , gorgojo del arroz
<i>Spodoptera frugiperda</i> , gusano cogollero de otoño	
Otros	
<i>Nephotettix nigropictus</i> , saltahojas del arroz	<i>Blissus leucopterus leucopterus</i> , chinche
<i>Acrosternum hilare</i> , chinche verde	<i>Colaspis brunnea</i> , colaspis de la vid

En una forma de realización, se proporciona un método para controlar plagas de insectos, o prevenir la infestación o el daño causado por plagas de insectos, o matar plagas de insectos en el trigo, que comprende presentar a dichas plagas una planta de trigo que incluye un plástido o constructo de ácido nucleico descrito antes. Preferentemente, la plaga de insectos se selecciona de la siguiente tabla.

Trigo:

Lepidópteros	Coleópteros
<i>Spodoptera frugiperda</i> , gusano cogollero de otoño	<i>Oulema melanopus</i> , escarabajo de la hoja del cereal
<i>Pseudaletia unipunctata</i> , cogollero	<i>Hypera punctata</i> , gorgojo de la hoja del trébol
<i>Elasmopalpus lignosellus</i> , taladro del tallo del maíz menor	<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> , Gusano de la raíz del maíz del sur

<i>Elasmopalpus lignosellus</i> , taladro del tallo del maíz menor	
<i>Agrotis orthogonia</i> , gusano cortador del oeste	
Otros	
<i>Melanoplus differentialis</i> , saltamontes diferencial	<i>Melanoplus femurrubrum</i> , saltamontes pata roja
<i>Mayetiola destructor</i> , mosca de Hess	<i>Melanoplus sanguinipes</i> , saltamontes migratorio
<i>Meromyza americana</i> , gusano del tallo del trigo	<i>Sitodiplosis mosellana</i> , mosquito del trigo
<i>Frankliniella fusca</i> , trips del tabaco	<i>Hylemya coarctata</i> , mosca del bulbo del trigo
<i>Aceria tulipae</i> , ácaro curvado del trigo	<i>Cephus cinctus</i> , mosca sierra del tallo del trigo
<i>Macrosiphum avenae</i> , áfido del grano inglés	<i>Schizaphis graminum</i> , bicho verde
	Áfido del trigo ruso

En una forma de realización, se proporciona un método para controlar plagas de insectos, o prevenir la infestación o el daño causado por plagas de insectos, o matar plagas de insectos en el algodón, que comprende presentar a dichas plagas una planta de algodón que incluye un plástido o constructo de ácido nucleico descrito antes. Preferentemente, la plaga de insectos se selecciona de la siguiente tabla.

Algodón:

Lepidópteros	Coleópteros
<i>Helicoverpa zea</i> , gusano del algodón	<i>Anthonomus grandis</i> , picudo

<i>Helicoverpa armigera</i> , gusano del algodón	
<i>Heliothis virescens</i> , cogollero del algodón	
<i>Spodoptera exigua</i> , gusano de la remolacha	
<i>Pectinophora gossypiella</i> , gusano rosado	
Otros	
<i>Pseudatomoscelis seriatus</i> , pulga saltona del algodón	<i>Aphis gossypii</i> , áfido del algodón
<i>Lygus lineolaris</i> , chinche empañada	<i>Trialeurodes abutilonea</i> , mosca blanca de alas en banda
<i>Melanoplus differentialis</i> , saltamontes diferencial	<i>Melanoplus femurrubrum</i> , saltamontes de pata roja
<i>Frankliniella fusca</i> , trips del tabaco	<i>Thrips tabaci</i> , trips de la cebolla
<i>Tetranychus urticae</i> , ácaro araña de dos manchas	<i>Tetranychus cinnabari nus</i> , ácaro araña carmín

En una forma de realización, se proporciona un método para controlar plagas de insectos, o prevenir la infestación o el daño causado por plagas de insectos, o matar plagas de insectos en la cebada, que comprende presentar a dichas plagas una planta de cebada que incluye un plástido o constructo de ácido nucleico descrito antes. Preferentemente, la plaga de insectos se selecciona de la siguiente tabla.

Cebada:

Lepidópteros	Coleópteros
<i>Ostrinia nubilalis</i> , barrenador del maíz	

europeo	
<i>Agrotis ipsilon</i> , gusano cortador negro	
Otros	
<i>Acrosternum hilare</i> , chinche verde	<i>Euschistus servos</i> , chinche marrón
<i>Delia platura</i> , gusano de la semilla del maíz	<i>Mayetiola destructor</i> , mosca de Hess
<i>Petrobia latens</i> , ácaro del trigo marrón	<i>Schizaphis graminum</i> , gusano verde
<i>Blissus leucopterus leucopterus</i> , chinche	

En una forma de realización, se proporciona un método para controlar plagas de insectos, o prevenir la infestación o el daño causado por plagas de insectos, o matar plagas de insectos en la colza oleaginosa, que comprende presentar a dichas plagas una planta de semilla oleaginosa que incluye un plástido o constructo de ácido nucleico descrito antes. Preferentemente, la plaga de insectos se selecciona de la siguiente tabla.

Colza oleaginosa

Lepidópteros	Coleópteros
<i>Plutella xylostella</i> , polilla dorso de diamante	<i>Phyllotreta cruciferae</i> , escarabajo pulga
<i>Mamestra configurata</i> , cogollero Bertha	
Otros	
<i>Delia</i> spp., gusano de la raíz	<i>Brevicoryne brassicae</i> , áfido del repollo

En una forma de realización, se proporciona un método para controlar plagas de insectos, o prevenir la infestación o el daño causado por plagas de

insectos, o matar plagas de insectos en la soja, que comprende presentar a dichas plagas una planta de soja que incluye un plástido o constructo de ácido nucleico descrito antes. Preferentemente, la plaga de insectos se selecciona de la siguiente tabla.

Soja:

Lepidópteros	Coleópteros
<i>Pseudoplusia includens</i> , gusano falso medidor de la soja	<i>Epilachna varivestis</i> , escarabajo del frijol mexicano
<i>Plathypena scabra</i> , gusano verde de la soja	<i>Cerotoma trifurcate</i> , escarabajo de la hoja del frijol
<i>Agrotis ipsilon</i> , gusano cortador grasiento	<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> , escarabajo del pepino manchado
<i>Heliothis virescens</i> , gusano del algodón	<i>Epicauta pestifera</i> , <i>Epicauta lemniscata</i> , escarabajos ampolla
<i>Ostrinia nubilalis</i> , barrenador europeo del maíz	<i>Popillia japonica</i> , escarabajo japonés
<i>Spodoptera exigua</i> , gusano de la remolacha	<i>Dectes texanus texanus</i> , barrenador del tallo de la hoja
<i>Helicoverpa zea</i> , gusano del algodón	<i>Colaspis brunnea</i> , colaspis de la vid
<i>Anticarsia gemmatilis</i> , oruga del frijol terciopelo	
<i>Heliothis zea</i> , gusano del maíz	
<i>Spodoptera ornithogalli</i> , gusano soldado de bandas amarillas	
<i>Colias eurytheme</i> , origa de la alfalfa	
<i>Elasmopalpus lignosellus</i> , taladro del tallo del maíz menor	

Otros	
<i>Empoasca fabae</i> , saltahojas de la papa	<i>Tetranychus turkestanii</i> , ácaro araña de la frutilla/ fresa
<i>Melanoplus femurrubrum</i> , saltamontes de pata roja	<i>Hylemya platura</i> , gusano de la semilla del maíz
<i>Tetranychus urticae</i> , ácaro araña de dos manchas	<i>Thrips tabaci</i> , trips de la cebolla
<i>Myzus persicae</i> , áfido verde del durazno	<i>Acrosternum hilare</i> , <i>Nezara viridula</i> , chinches verdes
<i>Melanoplus differentialis</i> , saltamontes diferencial	<i>Sericothrips variabilis</i> , trips de la soja
<i>Estigmene acrea</i> , oruga Saltmarsh	<i>Euschistus servus</i> , chinche marrón
<i>Sericothrips variabilis</i> , trips de la soja	Chinche verde del sur
<i>Epargyreus clarus</i> , saltador de manchas plateadas	Escarabajo ampolla con margen
<i>Spissistilus festinus</i> , saltador tres picos de la alfalfa	Escarabajo ampolla con franjas
	Barrenador del césped Bahía

Las plantas que comprenden un plástido o constructo de ácido nucleico según se describe en la presente se pueden usar en estrategias de Manejo de Resistencia de los Insectos (IRM).

Las estrategias de IRM generalmente implican la plantación de plantas transformadas y no transformadas (llamadas plantas de “refugio”) en estructuras particulares. En estas estructuras, las plantas de refugio proporcionan un reservorio para los insectos que no están bajo presión insecticida y que, por lo tanto, es menos probable que sean seleccionados para un alelo de resistencia insecticida. La cruza de estos insectos en el campo con

aquellos insectos que han sido seleccionados para una mutación que forma un alelo de resistencia insecticida muy probablemente genere genotipos heterocigotas, con lo cual disminuye la probabilidad de desarrollo de resistencia insecticida, o, de lo contrario, el tiempo hasta el desarrollo de resistencia. Los ejemplos de enfoques para IRM se muestran en www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/bt_corn_refuge_2006.htm.

Las estrategias de IRM se pueden mejorar mediante el "apilado" de constructos en plantas de modo de apuntar a múltiples vías del insecto, con lo cual se reduce aún más la probabilidad de herencia de un haplotipo de resistencia insecticida. Véase, por ejemplo, Roush *et al.*, que describen estrategias de dos toxinas, también llamadas "piramidación" o "apilado", para el manejo de cultivos transgénicos insecticidas (The Royal Society. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* (1998) 353, 1777–1786). Específicamente, el apilado o la piramidación de dos o más agentes activos insecticidas similares (por ejemplo, dos o más blancos de ARNdc diferentes) o distintos (por ejemplo, *Bt* o ARNi de plástido), cada uno efectivo contra las plagas blanco y con poca o ninguna resistencia cruzada, puede permitir el uso de un refugio menor. Roush sugiere que, para un apilado exitoso, un tamaño de refugio de menos de 10% de refugio puede proporcionar un manejo de resistencia comparable a aproximadamente 50% de refugio para un solo rasgo (no piramidal). Para los productos de maíz *Bt* piramidal actualmente disponibles, la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. requiere plantar significativamente menos refugio estructurado (generalmente 5%) de maíz no *Bt* que para productos de rasgo único (generalmente 20%).

Existen distintas maneras de proporcionar los efectos IRM de un refugio, que incluyen diversos patrones de plantación geométricos en los campos (como se mencionó antes) y mezclas de semillas en bolsa, como se analiza adicionalmente en Roush *et al.* (*supra*) y la patente de EE.UU. Nro. 6.551.962.

Los porcentajes anteriores, o relaciones de refugio similares, se pueden usar para las presentes pilas o pirámides que contienen 2, 3 o más agentes activos insecticidas. Para las pilas triples, con tres sitios de acción contra una sola plaga blanco, un objetivo puede ser mantener un refugio de individuos susceptibles, por ejemplo 5% de refugio. Esto es particularmente cierto para las superficies comerciales de más de 10 acres (aproximadamente 40 hectáreas), por ejemplo.

La dosis tiene impacto sobre la eficacia y confiabilidad para el manejo de la resistencia, lo que asegura que se disponga de una dosis letal para la plaga en el tiempo. En una forma de realización de la invención, la expresión de ARNdc disponible es mayor cuando se ubica en el plástido, lo que conduce a una mayor dosis disponible para la plaga blanco. El ARNdc dentro del plástido permanece estable durante todo el crecimiento y el desarrollo de la planta transgénica, manteniendo la disponibilidad de la dosis en el tiempo para la plaga blanco.

Las composiciones y los métodos divulgados en la presente se pueden usar juntos en combinaciones con otros métodos y composiciones para controlar el daño causado por las plagas. Por ejemplo, las plantas, plástidos y constructos de ácido nucleico descritos en la presente se pueden usar en un método que comprende el uso adicional de uno o varios agentes químicos efectivos contra una plaga coleóptera, lepidóptera y/o hemíptera, biopesticidas efectivos contra una plaga coleóptera, lepidóptera y/o hemíptera, rotación de cultivos, o técnicas genéticas recombinantes que exhiben características diferentes de las características de los métodos mediados por ARNi y las composiciones de ARNi de la invención (por ejemplo, la producción recombinante de proteínas en plantas que son nocivas para una plaga coleóptera, lepidóptera y/o hemíptera (por ejemplo, toxinas *Bt*)).

Según se usa en la presente, excepto donde el contexto requiere lo contrario, el término "abarcen" y variaciones del término, tales como "que

comprende", "comprende" y "comprendido", no tienen por fin excluir otros aditivos, componentes, enteros o pasos.

A menos que se indique específicamente o se implique lo contrario, los términos "un", "una", "el" y "la" significan "al menos uno", según se usan en la presente.

Se entenderá que la invención divulgada y definida en esta memoria descriptiva se extiende a todas las combinaciones alternativas de dos o más de las características individuales mencionadas o evidentes a partir del texto o los dibujos. Todas estas combinaciones diferentes constituyen diversos aspectos alternativos de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Constructos de ácido nucleico

Construcción del vector de transformación de cloroplasto pR1

Los constructos de transformación de cloroplasto fueron derivados del vector de transformación de cloroplasto pPRV323Clox (anteriormente, pPRV312L; NCBI acceso DQ489715.1) (Chakrabarti *et al.*, 2006 y Lutz *et al.*, 2007). Este vector fue diseñado para la transformación de *N. tabacum*, recombinando con las secuencias trnI y trnA del genoma de cloroplasto de *N. tabacum*. También se ha usado para transformar con éxito la *N. benthamiana* relacionada, ya que las regiones de recombinación de *N. tabacum* y *N. benthamiana* son 99,52% similares (sólo 10 de 2076 bp de diferencia) (Davarpanah *et al.*, 2009). El vector fue diseñado originalmente para expresión de lectura (de una secuencia de interés) a partir del promotor de ARN ribosomal corriente arriba (rrn16), o para la inserción de un casete de expresión completo corriente arriba del marcador seleccionable aadA. Este último contexto se usó en el presente ejemplo.

pPRV323Clox fue modificado primero usando 'PCR de mutación' para corregir un sitio de reconocimiento de enzima de restricción Kpn I no mapeado erróneamente presente 5' y adyacente a la rama de recombinación homóloga

3', que hubiera interferido con el plan de ensamblaje concebido que se describe a continuación. La secuencia se cambió según se indica: ...ATG(G>C)(TACCdel)GCT... para crear el vector pPRV323Clox(k-fix), en donde la secuencia original del vector, ATGGTACCGCT, se modificó a ATGCGCT. Un inserto de ARNdc sintético fue sintetizado para incluir las secuencias que codifican Asc I, el promotor *rrn* (*Prrn*), la región no traducida 5' del transcripto para el gen de subunidad mayor de rubisco de cloroplasto de *N. benthamiana* (*rbcl* 5' UTR), un sitio de clonación múltiple (MCS), y el *rbcl* 3' UTR y Not I (Genscript). El inserto fue entregado en un vector pUC57, extirpado con Asc I y Not I y sub-clonado en pPRV323Clox(k-fix) ya digerido con Asc I y Not I, para crear el nuevo vector, pR1.

Construcción del vector de ensamblaje de ARNdc 'golden gate', p32c-GG

Las unidades de expresión de ARNdc grandes se ensamblaron primero en un vector de 'ensamblaje' secundario antes de ser transferidas como unidades completas a pR1. Las unidades de expresión de ARNdc se elaboraron mediante una versión adicionalmente modificada del método 'Golden Gate' (GG) previamente adaptado para ensamblaje de repetición invertida (horquilla aka) (Yan *et al.*, 2012). Para establecer los componentes para este método de ensamblaje, el casete de clonación GG fue amplificado a partir de su vector original, pRNAi-GG (NCBI acceso JQ085427.1; disponible del Arabidopsis Biological Resource Center (ARBC), #CD3-1786), usando los cebadores g187f y g188r (véase la Tabla 3). El producto de PCR fue digerido con enzimas de restricción Xho I y Kpn I, e insertado en el vector binario, p32c, ya digerido de manera similar. p32c es una versión derivada interna del vector binario pORE-03, premodificado para incluir un promotor CaMV 35s (la versión -343 a +1) y un sitio de clonación múltiple (MCS) alterado. p32c también fue premodificado por PCR de mutación para remover un sitio de reconocimiento BsaI RE, GGTCTCN|NNNN (originalmente presente en el gen de marcador

seleccionable de fosfinotricina acetiltransferasa II, PPT), convirtiendo la secuencia según se indica: ...GAGAG(G>A)AG(A>G)CC..., ya que este sitio Bsal hubiera interferido con los consiguientes ensamblajes de horquilla GG. Dicho de otro modo, la secuencia GAGAGGAGACC en el vector fue modificada a GAGAGAAGGCC. Estos cambios dieron como resultado una mutación silenciosa, de modo que la secuencia de nucleótidos fue alterada pero la secuencia PPT traducida permaneció inalterada. El vector GG resultante, p32c–GG, se mantuvo en células DB3.1 de *E. coli*, ya que el vector de expresión GG codifica el gen *cddB* que, de lo contrario, causa la muerte de las células bacterianas en otras cepas de *E. coli* de laboratorio (por ejemplo, DH5alfa).

Ensamblaje de unidades de expresión de ARNdc grandes en el vector p32c–GG usando el método Golden Gate

Las unidades de expresión de ARNdc grandes que típicamente codifican horquillas con longitudes de tronco de hasta muchos cientos de pares de bases se prepararon en el vector de ensamblaje p32c–GG siguiendo el método descrito originalmente por Yan *et al.* para su vector similar pRNAi–GG, con las siguientes excepciones (Yan *et al.*, 2012). Se realizaron ligaduras en un búfer de ligadura suplementado con PEG (por ejemplo, un búfer de ligadura rápido 2x) durante 2 horas, el volumen de ligadura total se incrementó de manera acorde, se omitió la incubación final a 80°C (es incompatible con los búferes de ligadura con PEG), y se usaron células GT116 (Invitrogen) en lugar de DH5alfa (las células DH5alfa funcionaron, pero se recuperaron menos colonias en comparación con las células GT116). Se halló que el búfer basado en PEG constituía una modificación vital, ya que se recuperaron muy pocas o ninguna colonia sin él. Brevemente, el proceso de ensamblaje incluyó los siguientes pasos. El tronco blanco se amplificó por PCR usando KOD polimerasa (Toyobo) según el protocolo del fabricante, con cebadores diseñados para obtener el siguiente panorama:

Diseño del cebador directo = ACCA_GGTCTCA(GGAG)_bind, en donde: la secuencia 'ACCA' es el sitio de unión de la enzima de restricción 5' terminal (éste es un extra de 4 bases agregadas al extremo 5' terminal de modo de proporcionar cierta 'adquisición' adicional para que la enzima de restricción se pueda 'asir' a la secuencia cuando intenta cortar en la posición adyacente corriente abajo); '_' es simplemente un símbolo divisor para separar diferentes unidades funcionales en la secuencia taquigráfica cuando se escribe y no tiene una representación física en la secuencia real; 'GGTCTCA(GGAG)' es el sitio de la enzima de restricción (RE) Bsa I. A diferencia de la mayoría de los sitios de RE, reconocerá GGTCTCA, pero cortado fuera de éste, en los 4 nucleótidos 3' adyacentes (NNNN). Estos 4 nucleótidos pueden ser cualquier secuencia, y en este ejemplo, se usó la secuencia "(GGAG)" y en combinación con la secuencia de reconocimiento precedente Bsa I se denomina secuencia Bsa I tipo 'blue' (por ejemplo, GGTCTCAGGAG); y 'unir' (*bind*) es un marcador de posición genérico para representar cualquier secuencia específica que es necesario agregar al extremo 3' de cada cebador para 'unirse' a la secuencia blanco específica que se amplifica en la PCR subsiguiente, es decir, esta secuencia varía para cada blanco (véase, por ejemplo, SEC. ID Nro.:3 en la Tabla 3).

Diseño del cebador inverso = ACCA_GGTCTCA(TCGT)_bind (véase, por ejemplo, SEC. ID Nro.:4 en la Tabla 3).

Luego de la PCR, las reacciones se purificaron en columna (Qiagen) y se eluyeron en 30 µl de búfer de elución. La reacción GG luego se estableció con 50 ng de reacción de PCR purificada, 200 ng de vector, 5 U de Bsa I, 10 U de T4 ligasa, 2x RAPID LIG. BUFFER (New England Biolabs) y H₂O hasta 20 µl. La reacción GG se incubó a 37°C durante 2 horas + 5 min. a 50°C. Se sometió 3 µl de la reacción a electroporación en ~50 µl de una mezcla celular electro-competente de GT116 preparada de acuerdo con procedimientos estándar. Toda la mezcla de transformación se esparció sobre medio de

selección apropiado, que incluía kanamicina (para seleccionar el vector) y cloranfenicol (para seleccionar la inclusión de intrón). Típicamente, se recuperaron ~50 – 100's de colonias.

Construcción del vector de control de expresión de ARNdc nuclear v153

El vector de control de expresión de ARNdc nuclear mostrado en la Figura 1, v153, derivado del vector binario p32c, se elaboró como vector intermedio en el camino para ensamblar el correspondiente vector de transformación de cloroplasto, v206. Ambos vectores codificaban una unidad de expresión de ARNdc, Ha–AceHp1236–189, que fue diseñada para tener una configuración de tronco auto–complementaria 189 nt sentido (SE) / antisentido (AS), con los troncos separados por un espaciador nuclear / citoplásmico basado en intrón o un 'bucle' de ~1599 nt. La secuencia de tronco de 189 nt fue seleccionada para ser homóloga al gen de acetilcolinesterasa (Ace; NCBI acceso AF369793) a partir de la polilla lepidóptera, *Helicoverpa armigera* (Ha; gusano del algodón), comenzando en la posición nt 1236 (respecto del primer nt de la CDS) y continuando por una longitud total de 189 nt en la dirección 5'. El primer paso en el ensamblaje fue construir la unidad de expresión de ARNdc para hp1236–189 en el vector p32c–GG, usando el método ya descrito. Para el ensamblaje específico del ejemplo 1, la secuencia correspondiente a Ace1236–189 fue amplificada por PCR usando ADNc de *H. armigera*, y los cebadores g216f/r y g217f/r. El vector resultante, p32c–Ha–AceHp1236–189, fue renombrado v153, y sirvió como el vector de control de expresión de ARNdc nuclear. Éste se transformó en *N. benthamiana* usando métodos estándar de transformación de *Agrobacterium* y procesos de selección comúnmente conocidos por el especialista en el arte. v153 se ilustra en la Figura 1.A, mostrado en el contexto linealizado general como se esperaría que se formara luego de la integración en el genoma nuclear de *N. benthamiana*. Se muestra un esquema simplificado de la producción esperada de ARNdc y el procesamiento tipo ARNi a partir de este vector, junto con una representación

esquemática de los cebadores usados para ensayos de PCR subsiguientes para determinar la integración o expresión de este constructo de vector *in planta*.

Construcción del vector de transformación y expresión de cloroplasto de ARNdc v206

El vector de transformación de cloroplasto mostrado en la Figura 1, v206, se preparó a partir de v153 usando los vectores adicionales y los métodos descritos antes. v206, también denominado pR1–Ha–AceHp1236–189, fue ensamblado a partir de v153 usando v153 como donante para mover la unidad de expresión de ARNdc dentro de pR1. Esta transferencia se logró escindiendo la unidad de expresión de ARNdc con Xho I y Kpn I, y subclonándola en pR1 ya digerido con Sal I (extremos cohesivos compatibles con Xho I) y Kpn I. El vector resultante, v206, se muestra en la Figura 1.CB en el contexto de la secuencia genómica de cloroplasto circundante luego de su integración precisa en el genoma de cloroplasto de *N. benthamiana*. Se muestra un esquema simplificado de la producción de ARNdc esperada y el procesamiento de ARNi a partir de este vector, junto con una representación esquemática de los cebadores usados para los ensayos de PCR subsiguientes con este vector.

Construcción del vector de transformación y expresión de cloroplasto de ARNdc v301

El vector de transformación de cloroplasto mostrado en la Figura 1, v301, se preparó a partir de v206 usando los vectores adicionales y los métodos descritos antes. v301 se ensambló a partir de v206 reemplazando la región intrón PDK+CMr con una secuencia de intrón cloroplástica de 795 bp (intrón *atpF*) y regiones de flaqueo pequeñas. La secuencia de reemplazo se amplificó a partir de *Nicotiana benthamiana* usando los cebadores BEN0002F y BEN0003R. El vector resultante, v301, se muestra en la Figura 1.D en el contexto de la secuencia genómica de cloroplasto circundante luego de su

integración precisa en el genoma de cloroplasto de *N. benthamiana*. Se muestra un esquema simplificado de la producción de ARN_{dc} esperada y el procesamiento de ARN_i a partir de este vector, junto con una representación esquemática de los cebadores usados para los ensayos de PCR subsiguientes con este vector.

Ejemplo 2. Transformación de células huésped y cloroplastos

Métodos de cultivo tisular de N. benthamiana

Las plantas de *N. benthamiana* se introdujeron en cultivo tisular esterilizando primero un pequeño volumen de semillas (~50 µl de equivalente de volumen) con gas Cl₂. Un tubo abierto de las semillas fue gasificado en ese momento durante ~1 – 4 horas en una cámara de vidrio sellada con un recipiente abierto de 3 ml de 1 N HCl agregado a 100 ml de hipoclorito (4% disponible). Las semillas se esparcieron sobre medio de Murashige–Skoog con 3% (p/v) de sacarosa y 5% (p/v) de agar noble (MSN) (Murashige *et al.*, 1962). Las plantas se mantuvieron en macetas de 15 x 6 cm y se transfirieron a medio nuevo cada 2 – 3 semanas o según se requiriera.

Preparación de micro-portadores de oro (para bombardeo)

Se prepararon micro-portadores de oro de 0,6 micrones (Biorad) de acuerdo con el protocolo del fabricante para el Sistema de Entrega de Partículas Biolístico PDS–1000/He, el cual sigue el método de Sanford *et al.* (Sanford *et al.*, 1993). Brevemente, se pesaron 30 mg de micro-portadores en un tubo de centrifuga de 1,5 ml, se agregó 1 ml de etanol 70%, y la mezcla se sometió a vórtex durante 3 – 5 minutos. El oro se dejó asentar durante 15 minutos antes de centrifugar durante 5 segundos (hasta ~20.000 rcf). El sobrenadante se descartó. Se añadió 1 ml de agua estéril al oro, se sometió a vórtex durante 1 minuto, y se dejó reposar durante 1 minuto. El oro se peletizó por rotación durante 5 segundos, y se eliminó el sobrenadante. Los pasos de lavado con agua se repitieron dos veces hasta 3 veces en total. Se agregó 500

μl de glicerol 50% estéril al pellet final (la preparación se almacenó a 4°C y se puede utilizar durante hasta ~2 semanas). Este volumen proporcionó 10 preparaciones estándar.

Recubrimiento de ADN de micro-portadores de oro

Los micro-portadores de oro se recubrieron con ADN el día del bombardeo. Los micro-portadores preparados anteriormente se sometieron a vórtex durante ≥ 5 minutos para resuspender el oro. Para cada constructo, se retiró 50 μl (~3 mg) de la suspensión de oro en un tubo nuevo mientras se sometía a vórtex para evitar la decantación. Se agregó 5 μl de ADN (idealmente, a 1 ug/μl), 50 μl de 2,5 M CaCl_2 y 20 μl de 0,1 M espermadina a cada alícuota de oro. Si la concentración de ADN no era lo suficientemente alta, se agregó un volumen suficiente de ADN (> 5 ul) de hasta 5 ug, y los volúmenes de los componentes restantes se aumentaron proporcionalmente de manera acorde. Cada muestra se sometió a vórtex durante 3 minutos, se dejó reposar durante 10 minutos (más de lo que indicaban los fabricantes, 1 minuto) y se centrifugó durante 5 segundos. El sobrenadante se eliminó, se agregó 140 μl de etanol 70% al pellet, y la mezcla se sometió a vórtex hasta que se resuspendió (~ 1 min.). Los micro-portadores se dejaron reposar durante 1 min., se centrifugaron durante otros 5 segundos, y el sobrenadante se descartó. El paso se repitió, pero con 140 μl de etanol 100%. El pellet final de micro-portadores se resuspendió en 48 μl de etanol 100%, y se almacenó sobre hielo hasta el bombardeo (el mismo día). Este volumen proporcionó >6 'disparos' para usar en la transformación de cloroplastos.

Transformación de cloroplastos usando el método de bombardeo de partículas

La máquina Biolistic PDS-1000/He (Biorad) se movió bajo un gabinete de flujo laminar, la superficie se esterilizó rigurosamente con etanol 70%, y se aprestó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Según las recomendaciones, el helio fue de 'alto grado' (4,5; $> 99,995\%$ de pureza), ya

que menores grados pueden bloquear la máquina y/o contaminar las muestras. Los tamices de detención, los soportes de macro-portadores y los discos de macro-portadores se esterilizaron sumergiéndolos brevemente en etanol 100% antes de secarlos al aire sobre recipientes recubiertos con papel de filtro estéril. Los discos de ruptura de 1100 psi se sumergieron en isopropanol 70% y, mientras aún estaban húmedos (aunque no completamente mojados), se cargaron en la boquilla de disparo (se necesita un poco de isopropanol para un sellado adecuado). El primer 'disparo' de cada sesión fue con un disco de ruptura solamente (es decir, sin muestra), de modo de purgar el aire de las líneas y cargarlas con He. Cada preparación de micro-portador de oro se sonicó durante > 1 minuto, y se esparció 6 ul/disparo de manera homogénea sobre el centro de un macro-portador, colocado primero en el soporte del macro-portador y se dejó secar al aire (~1 – 5 minutos). Los bombardeos fueron a 6 cm (desde la boquilla) en un vacío de ~25 – 28 en Hg. Las hojas se bombardearon con el lado abaxial hacia arriba (el lado inferior), sobre placas de MSN. Las hojas se prepararon con hasta 24 horas de anticipación, con una sola hoja de ~2 – 3 cm² (o varias hojas más pequeñas) de una planta de cultivo tisular ubicada centralmente sobre un recipiente de cultivo estándar de 100 x 20 mm.

Selección de explantes, callos y plántulas (heteroplásmica)

Luego del bombardeo, las placas se sellaron inmediatamente con 2 envolturas de cinta de microporos (3M) y se mantuvieron en la oscuridad durante ~48 – 72 horas. Luego de esto, cada hoja se cortó en pequeños segmentos de ~0,5 – 1 cm² y se transfirieron asépticamente con el lado adaxial hacia arriba (boca arriba) a medio de selección de MSN que contenía 500 mg/l de espectinomicina, 2 mg/l de BAP y 0,5 mg/l de NAA (para inducir la formación de callos y brotes). El tejido se transfirió a medio fresco cada 2 – 3 semanas. El tejido no transformado toma un color amarillo pálido luego de ~2 – 4 semanas, y empiezan a aparecer callos a partir de las ~4 – 8 semanas en adelante. Los

callos se desprendieron del material de explanta cuando tuvieron $\sim 0,5 - 1 \text{ cm}^3$ y se transfirieron a medio separado. Los brotes emergentes se desprendieron de los callos lo antes posible y se mantuvieron en el mismo medio. Cuando los brotes hubieron desarrollado 1 – 2 hojas de $\sim 0,5 - 1 \text{ cm}^2$, se pasaron a medio MSN que contenía 500 mg/l de espectinomicina (pero sin hormonas) para inducir la formación de raíces. Luego de un adecuado desarrollo radicular, las plántulas se pasaron a la tierra.

Las células transformadas pueden ser heteroplásmicas, donde sólo una fracción del número total de cloroplastos de cada célula se transforman, u homoplásmica, donde la mayoría o todos los cloroplastos de cada célula se transforman. Se considera que los brotes de *Nicotiana* regenerados a partir de una hoja bombardeada luego de una sola ronda de selección, por ejemplo formación de callos, formación de brotes y aislación, e inducción de raíces, siempre son quiméricos (heteroplásmicos) (Maliga *et al.*, 2012 y Maliga *et al.*, 2004). Generalmente se considera que se alcanzan plantas homoplásmicas, o al menos genéticamente estables, mediante 2 o más rondas sucesivas de selecciones, dividiendo repetidamente los brotes recién formados en pequeñas piezas y reinduciendo la formación de callos. El nivel 'plásmico' se puede determinar mediante una reacción de PCR adecuada a través de la unión de inserción.

Extracción de ADN de callos o plántulas

Los callos individuales se muestrearon para extracción de ADN removiendo una pequeña sección de $\sim 2 - 3 \text{ mm}^3$. Las plántulas emergentes destinadas a extracción de ADN se cultivaron hasta el estadio de tener al menos 2 hojas de $\sim 0,5 - 1 \text{ cm}^2$ antes de que cada hoja única se cosechara para la extracción. Las extracciones de ADN se realizaron con un método básico de 'salificación'. Cada muestra de tejido se colocó en un tubo de franja de PCR de 200 μl con un pequeña bola de acero inoxidable estéril y $\sim 180 - 200 \mu\text{l}$ de búfer de extracción de ADN (0,5 M NaCl y 1% SDS). Los tubos se

agitaron vigorosamente en un molino mezclador a ~ 30 rps durante ~2 minutos. La placa de muestra se reorientó por reversión y volteado, y la placa se agitó nuevamente. Los tubos se centrifugaron usando una centrífuga de placas a 3800 rpm durante 1 hora. Se transfirió 100 µl de sobrenadante a una placa nueva con 200 µl de etanol 100%. La placa de muestra se volvió a centrifugar como antes. El sobrenadante se descartó invirtiendo firmemente la placa de muestra. La placa de muestra se centrifugó boca arriba durante ~20 segundos a ~300 rpm. Se agregó 200 µl de etanol 70% a cada cavidad (un lavado rápido), y el sobrenadante se descartó nuevamente invirtiendo firmemente la placa de muestra. La placa de muestra se centrifugó nuevamente boca arriba durante ~20 segundos a ~300 rpm. La placa de muestra se secó al aire a temperatura ambiente durante ~20 minutos, y el pellet se resuspendió en 100 µl de búfer T.E. y se almacenó a 4°C.

Generación de líneas de cloroplasto

Se generaron nueve líneas de plantas de *N. benthamiana* usando la transformación de cloroplasto v206 (muestras Nros. 1 a 9). Cada línea seleccionada era de un evento de transformación independiente. Cada línea era resistente a espectinomicina, y la incorporación de v206 en el genoma del cloroplasto fue confirmada por PCR. La *N. benthamiana* no transformada se mantuvo como control negativo, o no transformado (muestra Nro. 24), y se creó una línea transformada nuclear de v153 como se indicó previamente, y se mantuvo como control transformado nuclear positivo (muestra Nro. 17).

Ejemplo 3. Confirmación de la expresión transgénica usando RT-PCR

Extracción de ARN y tratamiento con DNasa

El ARN total se extrajo usando Trizol (Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El tejido para extracción de ARN se cosechó de manera similar a la descrita previamente para la extracción de ADN. El tejido se

lioofilizó y se molió con un mortero en N₂ líquido. Se agregó aproximadamente 1,5 ml de Trizol a ~0,5 – 1 ml de volumen equivalente de tejido finamente molido. Todos los demás volúmenes en el método estándar se incrementaron proporcionalmente de manera acorde (hasta 1,5 ml de Trizol usado). Se incluyó el paso de aislación opcional, en donde el homogenado inicial (inmediatamente después de la homogeneización) se centrifuga a 12.000 x g durante 10 minutos a ~4°C. El pellet se descartó, y el homogenado limpio se procesó adicionalmente según el protocolo. Cada muestra se resuspendió en ~30 – 50 µl de agua libre de Rnasa (por ejemplo, tratada con DEPC). Tras la extracción, las muestras de ARN se trataron con Dnasa de acuerdo con el protocolo del fabricante (New England Biolabs) para reducir la probabilidad de amplificaciones falsas positivas en pruebas de transcripción inversa subsiguientes. Brevemente, 8 µl de muestra de ARN se combinaron con 1 µl de búfer de Dnasa y 1 µl de enzima RQ1 DNasa (NEB). La reacción se incubó a 37°C durante ~30 minutos, momento en el cual se agregó 1 µl de solución de detención, y la mezcla se incubó adicionalmente a 65°C durante ~10 minutos para inactivar la Dnasa por completo.

RT-PCR

Cada muestra se sometió a PCR de transcripción inversa (RT-PCR) para evaluar la presencia de las especies de ARNdc largas. La RT-PCR usada fue una RT-PCR de 2 pasos, donde primero se realizó un solo paso de síntesis de ADNc, seguido por reacciones de PCR separadas para diferentes especies de ARN. Cada reacción de síntesis de ADNc se llevó a cabo con el kit Superscript III First Strand Synthesis (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los componentes incluidos específicos del usuario eran 5 µl de cebadores mixtos (1 µl de cada uno de g280r, g276r, g216f/r, g301r y oligo dT), 1 µl de dNTPs y 7 µl de muestra de ARN tratada con DNasa para un total de volumen de inicio del usuario de 13 µl. Luego de la síntesis de ADNc, se usó 1 µl de cada muestra como plantilla en reacciones de PCR estándar de 20 µl. Las

PCR se llevaron a cabo sobre muestras de cloroplasto v206 Nros. 1–9, el control nuclear v153 Nro. 17 y el control no transformado de *N. benthamiana* Nro. 24. Cada muestra fue amplificada con 3 series de cebadores diferentes, usando 2 condiciones de plantilla distintas: 1) el ARN extraído antes de la síntesis de ADNc como plantilla (para evaluar la posibilidad de contaminación del ADN en las muestras), y 2) las correspondientes series de muestras de ADNc. La primera serie de cebador de PCR fue diseñada para amplificar a través de la unión de intrón y tronco trasero para evaluar la presencia de las especies de ARN grandes que contienen ambos bucles de intrón en el tronco AS (cebadores g25f y g216f/r). La segunda serie fue interna a la región de tronco de ARNdc, pero unida en las extremidades del tronco para evaluar la presencia del tronco SE o AS de longitud completa independiente de la secuencia de bucle (cebadores g216f/r y g217f/r). La tercera serie fue una reacción de control para evaluar la presencia de la secuencia doméstica ubicua para eIF4E (cebadores g165f y g166r).

Como se muestra en la Figura 2, las 9 muestras de ADNc de cloroplasto fueron positivas para el intrón por PCR de tronco trasero, lo cual confirma la expresión de especies de ARN que contienen al menos ambas secciones (Figuras 2A y B). Dado que las secciones de intrón y AS están corriente abajo del tronco SE, este resultado indica la presencia de la región formadora de ARNdc de longitud completa. No hubo amplicón a partir de la reacción de PCR que contuviera ADNc de *N. benthamiana* transformada con el vector de control de expresión nuclear v153. Esto sería de esperar si el intrón estuviera empalmado eficientemente fuera del ARN durante o inmediatamente después de la transcripción en la planta. No hubo amplicón a partir de la reacción de PCR que comprende ADNc de *N. benthamiana* no transformada de control. Esto también era como se esperaba, ya que *N. benthamiana* no expresa la secuencia de ARNdc Ha–AceHp1236–189. Las reacciones de PCR ‘no RT’ (es decir, las reacciones donde sólo se usó ARN como plantilla antes de la síntesis

de ADNc) no mostraron amplicones que confirmaran que no hubo nivel detectable de contaminación de ADN que influenciara la formación del producto específico observado en las series de muestras de ADNc.

Las 9 muestras de ADNc de cloroplasto también fueron positivas para la PCR de ARNdc / hp específica para la región troncal (Figuras 2C y D), lo cual confirma adicionalmente que al menos el tronco SE y/o AS está presente en su totalidad para cada muestra. La muestra de transformación de cloroplasto v206 Nro. 8 exhibió una pequeña cantidad de producto en la reacción de control no RT, aunque fue mucho menor que la observada en la correspondiente reacción de ADNc. No hubo amplicón a partir de las reacciones de PCR que contenían ADNc del control de expresión nuclear v153, como sería de esperar si la región / horquilla de ARNdc expresada nuclear fuera procesada eficientemente en especies de tamaño de ARNsi menor, de ~19 – 24 bp, inmediatamente después de la transcripción en la planta, y al hacerlo se redujera la cantidad de ARNdc largo expresado por debajo de los niveles detectables. No hubo amplicón a partir de la reacción de PCR que contenía ADNc del control no transformado de *N. benthamiana*, como se esperaba.

Las muestras de ADNc de cloroplasto y las 2 muestras de ADNc de control fueron todas positivas para la secuencia doméstica eIF4E (Figuras 2E y F). Este resultado confirmó que todas las muestras de ADNc eran plantillas adecuadas para PCR, y así respalda la interpretación de que la muestra v153 no tiene ARNdc largo detectable, ya que muy probablemente es procesada eficientemente por vía de ARNi, como se espera. Las reacciones de control 'no RT' no tuvieron producto detectable en ninguna muestra, lo cual demuestra adicionalmente que las muestras estaban libres de una significativa contaminación del ADN.

Ejemplo 4. Cuantificación de ARNdc en transformantes de cloroplasto y controles usando Northern blotting

Las muestras de transformación de cloroplasto se sometieron adicionalmente a un análisis Northern blot de alto peso molecular (MW) o 'ARN grande' para detectar y cuantificar las cantidades relativas de ARNdc grande presente en las muestras de cloroplasto transformadas con respecto a la correspondiente muestra de control expresada nuclear (y el control no transformado). Se volvieron a preparar extracciones de ARN para cada una de las muestras Nros. 1–9, 17 y 24 de acuerdo con el método descrito previamente, con la excepción de que cada muestra se resuspendió en formamida en lugar de agua libre de RNasa (la muestra Nro. 6 fue omitida en esta serie de ejemplos, ya que no quedaba material suficiente para las extracciones de ARN adicionales). Se cargó aproximadamente 10 µl de cada muestra + 6 µl de tinción de carga de ARN formamida por línea (excepto para la muestra 7, donde sólo se disponía de 4 µl de muestra) en un TBE gel de agarosa 1,4%, y se corrió a 100 V hasta que los 2 frentes de tinción inferiores se separaron adecuadamente. El gel se tiñó con bromuro de etidio (EtBr) y se visualizó para graduar las cantidades de carga relativas (Figura 3.A). El gel se transfirió por capilares hasta el día siguiente sobre Hybond N+ (Amersham), y las muestras se entrecruzaron UV con la membrana. La membrana se pre-hibridó y se hibridó con PerfectHyb a 65°C. La sonda era una ribosonda de cadena SE de longitud parcial UTPp32 extraída de SP6 a partir de un vector inverso insertado HaAce1236 pGEM (v158); en otras palabras, la sonda debía detectar el anti-sentido de la secuencia blanco, o el tronco AS del ARNdc. La longitud de la sonda era de 538 nt, con ~357 nt homólogos a HaAce que se extendía en todos los 189 nt del blanco incorporado en el cloroplasto y las plantas transformadas nucleares. La membrana se expuso durante 1 hora.

Como puede observarse en la Figura 3.B, muchas de las muestras transformadas de cloroplasto poseían grandes cantidades de ARN de alto peso molecular específico correspondiente a un tamaño que era de esperar para las secuencias de ARNdc HaAce1236–189 si permanecieran sin procesar por la

maquinaria tipo ARNi. La correspondiente muestra de control de expresión nuclear Nro. 17 no mostró evidencia de ARNdc largo no procesado, con un nivel de señal de fondo similar al del control no transformado. Las cantidades de ARN fueron cuantificadas usando ImageJ, y fueron normalizadas a las cantidades cargadas (usando la imagen de EtBr). Los niveles de expresión relativos se calcularon como veces de cambio normalizado en la intensidad de banda respecto del control no transformado de *N. benthamiana* (establecido como 1). Como puede observarse en la Figura 3.C, todas las muestras de cloroplasto v206 tuvieron cantidades detectables de ARNdc específico. Hubo cierta variación entre las líneas, que no fue inesperada dada la naturaleza independiente de cada línea. Muchas líneas independientes en este ejemplo, en particular 1, 2, 4, 5, 8 y 9, exhibieron niveles bastante elevados de producción y acumulación de ARNdc. Cuando se normalizaron, resultó evidente que la muestra de control de expresión nuclear v153 no retuvo una cantidad detectable de ARNdc, un resultado coincidente con los datos de RT-PCR previos.

Ejemplo 5. Cuantificación de ARNsi en transformantes de cloroplasto y controles usando Northern blotting

Las muestras de transformación de cloroplasto se sometieron además a análisis Northern de bajo peso molecular (MW) o 'ARN pequeño' para detectar y cuantificar las cantidades relativas de productos procesados de tamaño de ARNsi como cabe esperar que estén presentes si el ARNdc en las muestras fuera expuesto a la maquinaria de procesamiento tipo ARNi. Se usaron las mismas extracciones de ARN que se utilizaron en el ejemplo 4 (las muestras Nros. 6 y 7 se omitieron en esta serie de ejemplos, ya que no quedaba suficiente material). Se cargó aproximadamente 25 µl de cada muestra + 25 µl de tinción de carga de ARN formamida por línea sobre gel PAGE 17%. Esto dio por resultado un rango estimado de cantidad cargada de ~18 – 42 µg. Antes de

la carga, el gel PAGE se pre-corrió a 150 V / 40 min. Una vez cargado, el gel se corrió a 150V / ~30 min. + 200 V / ~4–5 horas (hasta que el frente de tinte migró adecuadamente). El gel se tiñó con bromuro de etidio (EtBr) y se visualizó para graduar las cantidades de carga relativas (Figura 4.A). El gel fue electro-transferido a 45 V / 60 min. sobre Hybond N+ (Amersham), y las muestras se entrecruzaron UV con la membrana. La membrana se pre-hibridó y se hibridó con PerfectHyb a 42°C. La sonda se preparó de la misma manera que se describió antes, excepto que también se ‘carbonó’ mediante métodos estándar para dividirla en fragmentos de ~50 nt. La membrana se expuso durante 1 hora y 60 horas, sin diferencia en el límite de detección entre los 2 puntos temporales (aquí se muestra el punto temporal correspondiente a 1 hora).

La Figura 4.B muestra que ninguna de las muestras transformadas de cloroplasto mostró ningún signo de especies de ARN pequeño específicas para la sonda. Sin embargo, la muestra de control de expresión nuclear v153 (Nro. 17) mostró productos fuertes y claros correspondientes al rango de tamaño esperado de ~19 – 24 nt. El control no transformado de *N. benthamiana* no mostró unión específica en el rango de tamaño de ARN pequeño, como era de esperar. Las cantidades de ARN fueron cuantificadas usando ImageJ, Figura 4.C, y se normalizaron a las cantidades cargadas (usando la imagen de EtBr). Los niveles de expresión relativos se calcularon como veces de cambio normalizado en la intensidad de banda respecto del control no transformado de *N. benthamiana* (establecido como 1). La cuantificación confirma adicionalmente la interpretación de la imagen Northern, que muestra que ninguna muestra de cloroplasto exhibe evidencia de producción de especies de ARN pequeño, mientras que la muestra de control de expresión nuclear v153 posee altos niveles de ARN pequeños.

Ejemplo 6. Transformación de cloroplasto de especies de cultivos

El maíz se transforma sustancialmente, como se describe en general en la presente y en la solicitud de patente de EE.UU. Nro. 20080289063A1. Las transformaciones de tabaco, zanahoria, algodón, soja y cultivos de hoja comestibles (por ejemplo, lechuga) se llevan a cabo como se describe en general en la presente y en Verma y Danielle (2007) *Plant Physiol.* 145(4): 1129–1143. El arroz, el trigo, el sorgo, el girasol, la canola, la remolacha azucarera y la cebada se pueden transformar siguiendo los protocolos de Maliga (2014) Chloroplast Biotechnology, Humana Press. Los especialistas en el arte de la transformación de plantas pueden realizar modificaciones a los protocolos sobre la base de la especie de cultivo.

Ejemplo 7a. Actividad insecticida

Las plantas transplastómicas con cloroplastos que expresan ARN_{dc} fueron evaluadas en cuanto a la actividad insecticida en bioensayos realizados con larvas recién nacidas de *Helicoverpa armigera* sobre plántulas de *Nicotiana benthamiana* transgénica y salvaje. Las larvas de *Helicoverpa* sacaron de los huevos (obtenidos de una colonia mantenida por un insectario comercial; AgBiTech, Toowoomba, QLD) con dieta artificial y unas pocas horas después de la eclosión, las larvas individuales se recogieron con un cepillo de pelo de camello humedecido y se depositaron (20 individuos/placa Petri) sobre plántulas lavadas de 6 días de vida en placas Petri de plástico. Las placas Petri que contenían las plántulas infestadas con las larvas luego fueron selladas con una tapa que permitía el intercambio gaseoso. Las placas Petri se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas (28°C, ~60% de humedad relativa, 16:8 [luz : oscuridad]) durante 4 días, tras lo cual se registró el peso de las larvas sobrevivientes (Figura 5A). Se agregaron plántulas frescas del genotipo apropiado cada día a las placas Petri durante el período de alimentación de 4 días. Estos datos demuestran que en las cuatro líneas independientes transformadas con v206 (que expresa ARN_{hp} en el cloroplasto), las larvas se

redujeron significativamente ($p < 0,005$ $n = 7 - 13$) en su tasa de crecimiento en comparación con aquellas alimentadas con plántulas de *N. benthamiana* de tipo salvaje. La tasa de crecimiento de las larvas alimentadas con dos líneas transforadas con v153 (que expresa ARNhp en el núcleo/ citoplasma) no fueron significativamente diferentes ($p > 0,9$; $n = 4-7$) de aquellas alimentadas con la variedad salvaje.

Ejemplo 7b. Actividad insecticida

La actividad insecticida se puede medir mediante distintos bioensayos, según conocen los especialistas en el arte, que incluyen, entre otros, aquellos descritos a continuación. Las plagas de insectos lepidópteros incluyen, aunque no a modo de limitación, *Helicoverpa* sp., *Agromyza parvicornis*, *Agrotis ipsilon*, *Diatraea* sp., *Elasmopalpus lignosellus*, *Ostrinia nubilalis*, *Spodoptera* sp., *Papaipema nebris*, *Heliothis* sp., *Pectinophora gossypiella*, *Plutella xylostella*, *Mamestra configurata*, *Pseudoplusia includens*, *Plathypena scabra*, *Anticarsia gemmatalis*, *Colias eurytheme*, *Achoroia grisella*, *Acleris gloverana*, *Acleris variana*, *Adoxophyes orana*, *Alabama argillacea*, *Alsophila pometaria*, *Amyelois transitella*, *Anagasta kuehniella*, *Anarsia lineatella*, *Anisota senatoria*, *Antheraea pernyi*, *Archips* sp., *Argyrotaenia* sp., *Athetis mindara*, *Bombyx mori*, *Bucculatrix thurberiella*, *Cadra cautella*, *Choristoneura* sp., *Cochylis hospes*, *Corcyra cephalonica*, *Cydia latiferreanus*, *Cydia pomonella*, *Datana integerrima*, *Dendrolimus sibericus*, *Desmia feneralis*, *Diaphania hyalinata*, *Diaphania nitidalis*, *Ennomos subsignaria*, *Eoreuma loftini*, *Espehstia elutella*, *Erannis tilaria*, *Estigmene acrea*, *Eulia salubricola*, *Eupocoellia ambiguella*, *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Euxoa messoria*, *Galleria mellonella*, *Grapholita molesta*, *Harrisina americana*, *Hemileuca oliviae*, *Homoeosoma electellum*, *Hyphantia cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Lambdina fiscellaria fiscellaria*, *Lambdina fiscellaria lugubrosa*, *Leucoma salicis*, *Lobesia botrana*, *Loxostege sticticalis*, *Lymantria dispar*, *Macalla thyrisalis*, *Malacosoma* sp.,

Mamestra brassicae, *Manduca quinquemaculata*, *Manduca sexta*, *Maruca testulalis*, *Melanchra picta*, *Operophtera brumata*, *Orgyia* sp., *Paleacrita vernata*, *Papilio cresphontes*, *Phryganidia californica*, *Phyllonorycter blancardella*, *Pieris napi*, *Pieris rapae*, *Platynota flouendana*, *Platynota stultana*, *Platyptilia carduidactyla*, *Plodia interpunctella*, *Pontia protodice*, *Pseudaletia unipuncta*, *Sabulodes aegrotata*, *Schizura concinna*, *Sitotroga cerealella*, *Spilonta ocellana*, *Thaurnstopoea pityocampa*, *Ensola bisselliella*, *Trichoplusia hi*, *Udea rubigalis*, *Xylomyges curialis*, y *Yponomeuta padella*.

Las plantas transplastómicas con cloroplastos que expresan ARNdc son evaluadas en cuanto a su actividad insecticida en bioensayos realizados con larvas recién nacidas de lepidópteros con dieta de insectos artificial. Las larvas de lepidópteros se extraen de huevos obtenidos de una colonia mantenida por un insectario comercial (Benzon Research Inc., Carlisle, PA).

Estos bioensayos se realizan en bandejas plásticas de 128 cavidades específicamente diseñadas para bioensayos de insectos (C–D International, Pitman, NJ). Cada cavidad contiene dieta de lepidópteros multi-especie (Southland Products, Lake Village, AR). Se incorpora material de planta macerado de eventos transplastómicos en la dieta.

Unas pocas horas después de la eclosión, las larvas individuales se recogen con un cepillo de pelo de camello humedecido y se depositan sobre la dieta tratada, una larva por cavidad. Las cavidades infestadas luego se sellan con planchas adhesivas de plástico transparente, y se ventilan para permitir el intercambio gaseoso (C–D International, Pitman, NJ). Las bandejas del bioensayo se mantienen bajo condiciones ambientales controladas (28°C, ~60% de humedad relativa, 16:8 [luz : oscuridad]) durante 5 días, tras lo cual se registra el número total de insectos expuestos a cada muestra, el número de insectos muertos y el peso de los insectos sobrevivientes. Se calcula la mortalidad porcentual y la inhibición del crecimiento porcentual para cada

tratamiento. La inhibición del crecimiento (GI) se calcula de la siguiente manera:

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

donde TWIT es el Peso Total de Insectos en el Tratamiento,

TNIT es el Número Total de Insectos en el Tratamiento

TWIBC es el Peso Total de Insectos en el Control de Referencia (control de búfer), y

TNIBC es el Número Total de Insectos en el Control de Referencia (control de búfer).

La GI_{50} (Inhibición del Crecimiento) se define como la dosis a la cual el crecimiento medio (por ejemplo, el peso vivo) de los insectos de ensayo es el 50% del valor medio observado en las muestras de Control de Referencia. El análisis estadístico se realiza usando software JMP™ (SAS, Cary, NC). La LC_{50} (Concentración Letal) se define como la dosis a la cual el 50% de los insectos de ensayo son destruidos.

Para algunas especies, los bioensayos se realizan en bandejas de ensayo de 32 cavidades. Se aplica aproximadamente 5 ml de una solución de agar en agua 2% a cada cavidad, y se deja que el agar se solidifique por completo.

Las plantas tienen aproximadamente 3 semanas de vida y son evaluadas en la generación T1. Se completan tres replicados de material de hoja T1. Se corta una hoja (2,54 cm x 1,27 cm, rectangular) y se coloca en una sola cavidad de la bandeja. Cada cavidad se infesta con 10 larvas de insecto individuales.

Las cavidades infestadas se sellan con planchas adhesivas de plástico transparente y se ventilan para permitir el intercambio gaseoso (C-D International, Pitman, NJ). Las bandejas se colocan en una incubadora Conviron y se mantienen a 28°C (16:8h de luz : oscuridad, 60% de HR) durante

3 días, tras lo cual se registra la cantidad total de daño a cada trozo de hoja (0, 5, 10, 15, 25, 50, 75% de daño, etc., hasta 100%).

Ejemplo 8: Bioensayo de plantas transgénicas

La bioactividad del ARNdc producido en células de plantas transplastómicas se demuestra mediante métodos conocidos para el especialista en el arte (véase, por ejemplo, Huang *et al.*, 2006 Econ. Entomol. 99: 194–202). La eficacia se puede demostrar alimentando con diversos tejidos de plantas o partes de tejido derivados de una planta que produce el ARNdc a insectos blanco en un ambiente de alimentación controlado. Alternativamente, se pueden preparar extractos de ARNdc a partir de distintos tejidos de plantas derivados de una planta que produce el ARNdc e incorporarlos en un bioensayo de dieta artificial como se describió previamente en la presente. Se entenderá que los resultados de dichos ensayos de alimentación se deben comparar con bioensayos conducidos de manera similar, que empleen tejidos de control apropiados de plantas huésped que no producen el ARNdc, o con otras muestras de control.

La actividad biológica de diversos eventos producidos en plantas de un constructo se evalúa para prevenir el daño a las hojas causado por la actividad de alimentación de insectos lepidópteros.

Se toma un corte de hoja de 1,0 x 0,5 pulgadas cuadradas por duplicado de la hoja V3 o V4, o de V5 (en el caso del maíz) de plantas transgénicas T₀. Para cada ensayo, primero se muestrean tejidos de hoja de planta salvaje para evitar la contaminación cruzada en los bordes de la hoja, seguido por las plantas transformadas. En cada cavidad de la bandeja de bioensayo (bandejas de 32 cavidades con tapa, CD International, Pitman, NJ), se coloca un corte de hoja sobre agar en agua 2% (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), y esto se replica 2 veces por especie de insecto, por evento y por constructo. Cada cavidad se infesta con diez neonatos de lepidópteros y se sella con una tapa de plástico

perforada para permitir el intercambio de aire. Las bandejas se colocan a 28°C (16:8 horas de luz : oscuridad, 40% de HR) y luego de 3 días de gradúan en cuanto al porcentaje de daño a la hoja. Los datos de porcentaje de daño a la hoja se analizan con ANOVA y separaciones medias con la prueba de Tukey–Kramer cuando las varianzas son homogéneas usando JMP® Pro 9.0.1 (2010 SAS Institute Inc., Cary, NC).

Tabla 3: Constructos de vector usados en este trabajo

Nombre del vector:	Descripción
pPRV323Clox (anteriormente pPRV312L),	Un vector de transformación de cloroplasto básico (NCBI acceso DQ489715.1), diseñado para la expresión de lectura de secuencias recombinantes.
pPRV323Clox (k–fix)	Una modificación de pPRV323Clox en la cual se eliminó un sitio Kpn I adicional no mapeado.
pR1	Una modificación de pPRV323Clox (k–fix) que incluye secuencias adicionales (promotor de cloroplasto, 5' UTR, MCS y 3' UTR) para expresión de transgén discreta / auto–contenida en el cloroplasto.
pORE–03	Un vector 'binario' de planta básico para transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> .

Nombre del vector:	Descripción
p32c	Una modificación de pORE–03 que incorpora un promotor CaMV 35s y MCS para la expresión de transgén. También se eliminó un sitio Bsa I RE de la columna sin alterar la función de ninguna parte del vector.
pRNAi–GG	Un vector de ensamblaje de reacción Golden Gate (GG) básico para ensamblaje basado en GG de horquillas.
p32c–GG	Una modificación de p32c que incorpora la sección de ensamblaje GG de pRNAi–GG de modo de permitir el ensamblaje basado en GG de horquillas dentro de la columna p32c.
v153 (p32c–HaAce Hp123 6–189)	Una modificación de p32c–GG en donde la horquilla que apunta a Ha–Ace1236–189 ha sido ensamblada.

Nombre del vector:	Descripción
v206 (pR1– HaAce Hp123 6–189)	Una modificación de pR1 en donde se introdujo la horquilla ensamblada a GG que apunta a Ha–Ace1236–189.
v301	Una modificación de v206 en donde la horquilla ensamblada que apunta a Ha–Ace1236–189 fue modificada para reemplazar el intrón nuclear PDK (+CMr) con el intrón cloroplástico atpF.
v158	Un vector basado en pGEM que contiene la secuencia Ha–1236–189 para actuar como plantilla para hacer sondas para análisis Northern de secuencias relacionadas con Ha–1236–189.

Tabla 4: Secuencias de oligonucleótidos usadas en este trabajo

SEC. ID NRO.:	Nombre	Secuencia (5'–3')	Descripción
SEC. ID NRO.: 1	g187f	CGCTCGAGCGGAGTG AGACCAATTCTCG	cebador directo para mover el casete GG en p32c
SEC. ID NRO.: 2	g188r	CGGGTACCCGGAGTG AGACCCTGTGTAT	cebador inverso para mover el casete GG en p32c
SEC. ID NRO.: 3	g216f/r	ACCAGGTCTCAGGAG CATGGAGTTGGATGA CAGGA	cebador directo hp1236– 189, extremos Bsa I.
SEC. ID NRO.: 4	g217f/r	ACCAGGTCTCCTCGA GCTGACGGGAATCCC AATATG	cebador inverso hp1236– 189, extremos Bsa I.
SEC. ID NRO.: 5	g25f	TGATAGATCATGTCAT TGTG	cebador inverso intrón Ft. PDK.
SEC. ID NRO.: 6	g165f	TGAAGTAGAGAAACC GGCGT	cebador directo N.b. eIF4E.
SEC. ID NRO.: 7	g166r	CCAAGCAGCCTGTTT CGATT	cebador inverso N.b. eIF4E.

SEC. ID NRO.:	Nombre	Secuencia (5'–3')	Descripción
SEC. ID NRO.: 8	g280r	AACGACCCAATTGCA AGAGCGGAGCTCTAC CAACTGAGCTATATCC CCCCGAGCCAAGTGG AGCGCATTAAATAGT GTACCATAAC	cebador inverso de región de recombinación 3' homóloga
SEC. ID NRO.: 9	g276r	CGAAGGATAATTACTT GAGTTC	cebador inverso rbcL 3' UTR.
SEC. ID NRO.: 10	g301r	TACTCCTACTCATAAT GTTTTGTTACTACTCA TAACTGTTTCTTACTC BEN000 TTTGATATTATTTGTTA	cebador directo intrón Ft. PDK.
SEC. ID NRO.: 11	2F	CTTTAGC BEN000 GCATGCAAATCTAAGT	Secuencias atpF intrón y de flanqueo pequeñas. Cebador directo
SEC. ID NRO.: 12	3R	GTAGTGCT CATATGTCGAATAGTA TTCAAGATCCT	Secuencias atpF intrón y de flanqueo pequeñas. Cebador inverso.