

SUPRESIÓN DEL ARNI PARENTAL DEL GEN HUNCHBACK PARA CONTROLAR PLAGAS DE COLEÓPTEROS

Reivindicación de prioridad

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de
presentación de la solicitud de patente provisional de Estados
Unidos serie N°. 62/092.772, presentada el 16 de diciembre de 2014,
titulada “SUPRESIÓN DEL ARNI PARENTAL DEL GEN HUNCHBACK
PARA CONTROLAR PLAGAS DE COLEÓPTEROS”, y de la solicitud
10 de patente de Estados Unidos provisoria serie N°. 62/170.079,
presentada el 12 de junio de 2015, titulada “SUPRESIÓN DEL ARNI
PARENTAL DEL GEN HUNCHBACK PARA CONTROLAR PLAGAS DE
HEMÍPTEROS”; ambos documentos se incorporan en la presente en
su totalidad.

Campo de la invención

 La presente invención se refiere en términos generales al
control genético del daño en las plantas causado por las plagas de
coleópteros. En modalidades particulares, la presente divulgación se
refiere a la identificación de polinucleótidos que codifican y no
20 codifican dianas, y a la utilización de tecnologías de ADN
recombinante para la expresión de represión o inhibición
postranscripcional de polinucleótidos que codifican y no codifican
dianas, en las células de una plaga de coleópteros, a efectos de
proveer una protección a las plantas.

Antecedentes de la Invención

El gusano occidental de las raíces del maíz (WCR, por sus siglas en inglés), *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, es una de las especies de gusano de las raíces del maíz en los Estados Unidos más devastadoras y es tema de preocupación particular en las áreas maiceras del centro oeste de los Estados Unidos. El gusano nortño de las raíces del maíz (NCR, por sus siglas en inglés), *Diabrotica barberi* Smith y Lawrence, es una especie estrechamente emparentada, cuyo hábitat coincide en gran parte con el del WCR. Hay varias otras especies relacionadas de *Diabrotica* que constituyen plagas significativas en las Américas: el gusano mexicano de las raíces del maíz (MCR, por sus siglas en inglés), *D. virgifera zea* Krysan y Smith; el gusano sureño de las raíces del maíz (SCR, por sus siglas en inglés), *D. undecimpunctata howardi* Barber; *D. balteata* LeConte; *D. undecimpunctata tenella*; *D. speciosa* Germar; y *D. u. undecimpunctata Mannerheim*. El departamento de agricultura de los Estados Unidos ha estimado que los gusanos de las raíces del maíz ocasionan un daño equivalente a 1,000 millones de dólares anuales por pérdida de ingresos, lo que incluye 800 millones por pérdidas en rendimiento y 200 millones en costos de tratamiento.

Tanto WCR como NCR son depositados en el suelo como huevos durante el verano. Los insectos permanecen en la etapa de huevo a lo largo del invierno. Los huevos tienen forma alargada, son blancos y tiene una longitud inferior a 0.1 mm. Las larvas eclosionan a finales de mayo o a principios de junio; el momento exacto de la eclosión de los huevos varía de año a año en función de las

diferencias de temperatura y de la ubicación geográfica. Las larvas recién eclosionadas son gusanos blancos con una longitud inferior a 3.18 mm. Una vez eclosionadas, las larvas empiezan a alimentarse de las raíces del maíz. Los gusanos de las raíces del maíz pasan por tres etapas de metamorfosis larvales. Después de alimentarse durante varias semanas, las larvas mudan al estadio de crisálida o pupal. Pupan en el suelo, y seguidamente emergen desde el suelo como adultos en julio y agosto. Los gusanos de las raíces adultos tienen una longitud de aproximadamente 6.35 mm.

Las larvas de las raíces del maíz completan su desarrollo en el maíz y en varias otras especies de gramíneas. Las larvas criadas en base a carricera verde emergen más tarde y el tamaño de sus cápsulas de cabeza es inferior al de los adultos cuando se compara con las larvas criadas en base a maíz. Ellsbury *et al.* (2005) Environ. Entomol. 34:627-34. Los WCR adultos se alimentan del estigma, polen, y granos del maíz, sobre las puntas de mazorca expuestas. Los adultos pasan rápidamente a alimentarse de estigmas y polen preferidos, en cuanto éstos se encuentren disponibles. Los NCR adultos también se alimentan de los tejidos reproductivos de la planta de maíz. Típicamente, las hembras de WCR se aparean una sola vez. Branson *et al.* (1977) Ann. Entom. Soc. America 70(4):506-8.

La mayor parte del daño causado por los gusanos de las raíces en el maíz es causada por la alimentación de las larvas. Las larvas de los gusanos de raíces recién eclosionadas se alimentan de los

finos pelos de las raíces del maíz y cavan surcos en las puntas de las raíces. A medida que las larvas crecen, se alimentan de las raíces primarias y cavan en éstas. Cuando los gusanos de las raíces del maíz son abundantes, la alimentación larval resulta frecuentemente en el podado de las raíces a todo su largo hasta la base del tallo del maíz. El serio daño infligido en las raíces interfiere con la capacidad de las raíces para transportar agua y nutrientes hacia el interior de la planta, reduce el crecimiento de las plantas, y tiene como resultado una menor producción de granos, con lo cual frecuentemente se reduce drásticamente el rendimiento general de la cosecha. Este daño infligido en las raíces también tiene frecuentemente como resultado un recostamiento de la planta de maíz, lo que dificulta la cosecha y además disminuye el rendimiento. Además, la alimentación de los adultos sobre los tejidos reproductivos de maíz puede resultar en el podado de los estigmas en la punta de la mazorca. Si este “podado del estigma” es suficientemente severo durante el desgranado, puede interrumpirse la polinización.

El control de los gusanos de las raíces del maíz puede intentarse mediante la rotación de cultivos, insecticidas químicos, bioplaguicidas (por ejemplo, la bacteria grampositiva formadora de esporas, *Bacillus thuringiensis*), plantas transgénicas que expresen toxinas *Bt*, o una de sus combinaciones. La rotación de los cultivos adolece de la desventaja de colocar restricciones sobre el uso de los terrenos agrícolas. Además, la oviposición de algunas especies de

gusanos de raíz puede tener lugar en campos de cultivo distintos de los del maíz, o las diapausas prolongadas tienen como resultado que los huevos eclosionan a lo largo de múltiples años, con lo cual se mitiga la efectividad de la rotación de cultivos practicada con maíz y otras plantas de cultivo.

Los insecticidas químicos son la estrategia más utilizada para lograr el control de los gusanos de las raíces del maíz. Sin embargo, el uso de insecticidas químicos es una estrategia imperfecta para el control de los gusanos de las raíces del maíz; pueden perderse más de 1,000 millones de dólares cada año en los Estados Unidos debido al gusano de las raíces del maíz cuando se añaden los costos de los insecticidas químicos a los costos del daño infligido por los gusanos de las raíces que pueden ocurrir a pesar del uso de los insecticidas. Las elevadas poblaciones de larvas, lluvias intensas, y una aplicación inadecuada del o de los insecticidas, pueden resultar, todos ellos, en un control inadecuado de los gusanos de las raíces del maíz. Además, el uso prolongado de insecticidas puede dar origen a una selección de cepas de raíces de gusanos de raíz resistentes a los insecticidas, y además puede ser causa de inquietudes ambientales debido a su toxicidad con respecto a especies no diana.

La interferencia de ARN (ARNi, por sus siglas en inglés) es un proceso en el que se utilizan vías celulares endógenas, por medio del que una molécula de ARN de interferencia (ARNi, por sus siglas en inglés) (por ejemplo, una molécula de ARN doble (dsARN, por sus

siglas en inglés) que es específica para la totalidad o para una porción de magnitud adecuada, de una secuencia de gen diana resulta en la degradación del mRNA codificado por ella. En años recientes, se ha usado el ARNi para llevar a cabo la “atenuación”
 5 génica en una cantidad de especies y de sistemas experimentales; por ejemplo, *Caenorhabditis elegans*, plantas, embriones de insectos, y células en cultivos de células. Ver, por ejemplo, Fire *et al.* (1998) Nature 391:806-811; Martínez *et al.* (2002) Cell 110:563-574; McManus y Sharp (2002) Nature Rev. Genetics 3:737-747.

10 El ARNi lleva a cabo la degradación del mRNA por medio de una vía endógena que incluye el complejo de proteínas DICER. El DICER libera por escindir cuatro moléculas largas de dsARN en breves fragmentos de aproximadamente 20 nucleótidos, que lleva la denominación de ARN de interferencia pequeños (siARN, por sus
 15 siglas en inglés). El siARN se desarrolla en dos ARN de cadena simples: la cadena pasajera y la cadena guía. La cadena pasajera se degrada, y la cadena guía es incorporada en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés). Los microácidos nucleicos (miARN, por sus siglas en inglés) son
 20 moléculas estructuralmente similares que han sido escindidas a partir de moléculas precursoras que contienen un “bucle” polinucleótido que conecta las cadenas pasajera y guía hibridadas y pueden estar incorporados de manera similar en el RISC. Tiene lugar un silenciamiento postranscripcional de los genes cuando la cadena
 25 guía se liga específicamente a una molécula de mRNA

complementaria e induce el desdoblamiento por Argonaute, que es el componente catalítico del complejo RISC. Es sabido que este proceso dispersa ampliamente algunos organismos eucariotas a pesar de concentraciones inicialmente limitadas de siARN y/o de miARN tales como plantas, nematodos y algunos insectos.

Solamente los transcriptos complementarios con el siARN y/o miARN se escinden y degradan, y por lo tanto la atenuación de la expresión de ARNm es específica con respecto a las secuencias. En las plantas existen varios grupos funcionales de genes DICER. El efecto del silenciamiento de genes por el ARNi dura varios días y, en condiciones experimentales, puede conducir a una declinación en la abundancia del transcripto etiquetado del 90% o más, con la consecuente expresión en los niveles de la proteína correspondiente. En los insectos, hay por lo menos dos genes DICER, en donde DICER1 facilita la degradación, dirigida por miARN, por Argonaute1. Lee *et al.* (2004) Cell 117(1):69-81. DICER2 facilita la degradación, dirigida por siARN, por Argonaute2.

En la patente de Estados Unidos N°. 7,612,194 y en las publicaciones de patente de Estados Unidos Nos. 2007/0050860, 2010/0192265, y 2011/0154545 se divulga una biblioteca de 9112 secuencias etiquetadas de secuencia expresada (EST, por sus siglas en inglés) aisladas a partir de crisálidas de *D. v. virgifera* LeConte. Se sugiere en la patente de Estados Unidos N°. 7,612,194 y en la publicación de patente de Estados Unidos N°. 2007/0050860 ligar operablemente a un promotor una molécula de ácido nucleico que es

complementaria de una o varias secuencias particulares de H⁺-ATPas de tipo vacuolar *D. v. virgifera* (V-ATPasa, por sus siglas en inglés) divulgada en la presente para la expresión de ARN antisentido en células de planta. La publicación de patente de Estados Unidos N°. 2010/0192265 sugiere ligar operablemente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria con respecto a una secuencia parcial particular de un gen de *D. v. virgifera* de función desconocida y no divulgada (se afirma que la secuencia parcial tiene una identidad del 58% con respecto al producto génico C56C10.3 en *C. elegans*) para la expresión del ARN antisentido en células de plantas. La publicación de patentes No. 2011/0154545 sugiere ligar operablemente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria para dos secuencias parciales particulares de dos genes subunidad beta coatómero *D. v. virgifera* para la expresión de ARN antisentido en células de plantas. Por otra parte, en la patente de Estados Unidos N°. 7,943,819 se divulga una biblioteca de 906 secuencias etiquetadas de secuencia expresada (EST, por sus siglas en inglés) aislados a partir de larvas y crisálidas de *D. v. virgifera* LeConte y de sus intestinos medios disecados, y sugiere ligar operablemente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria con respecto a una secuencia parcial particular de un gen 4b de proteína corporal multivesicular cargado con *D. v. virgifera* para la expresión del ARN doble en células de plantas.

No se provee ninguna otra sugerencia en la patente de Estados

Unidos N°. 7,612,194, ni en las publicaciones de patente de Estados Unidos Nos. 2007/0050860, 2010/0192265 y 2011/0154545 para utilizar alguna secuencia particular de entre más de nueve mil secuencias enumeradas en la presente para la interferencia por

5 ARN, salvo las diversas secuencias parciales particulares de V-ATPasa y de las secuencias parciales particulares de genes de función desconocida. Por otra parte, ninguna de la patente de Estados Unidos N°. 7,612,194 ni en la publicación de patente de Estados Unidos Nos. 2007/0050860 y 2010/0192265, y 2011/0154545

10 se provee alguna guía acerca de cuál de las otras más de novecientas secuencias provistas sería letal, o de alguna otra manera útil, en especies de gusanos de las raíces de maíz cuando se utiliza como dsARN o como siARN. La patente de Estados Unidos N°. 7,943,819 no prevé ninguna sugerencia acerca del uso de alguna

15 secuencia particular de entre las de más de novecientas secuencias enumeradas en la presente para la interferencia de ARN, con la salvedad de la secuencia parcial particular de un gen 4b de proteína corporal multivesicular cargado. Por otra parte, la patente de Estados Unidos N°. 7,943,819 no prevé ninguna guía acerca de cuál

20 de las otras novecientas secuencias sería letal, o de alguna otra manera útil, en especies de gusanos de raíz de almidón cuando se utilizan como dsARN o siARN. La publicación de solicitud de patente Estados Unidos N°. 2013/040173 y la publicación de solicitud de patente PCT N°. WO 2013/169923 describen el uso de una secuencia

25 derivada de un gen de *Diabrotica virgifera* Snf7 para la interferencia

de ARN en el maíz (también divulgado en: Bolognesi *et al.* (2012) PLoS ONE 7(10): e47534. doi:10.1371/journal.pone.0047534).

La abrumadora mayoría de secuencias que son complementarias con respecto a los ADN de los gusanos de las raíces del maíz (tales como las anteriormente descritas) no proveen un efecto fitoprotector contra especies de gusanos de las raíces del maíz cuando se utilizan como dsARN o como siARN. Por ejemplo, Baum *et al.* (2007) Nature Biotechnology 25:1322-1326, describe el efecto de inhibir varios genes diana de WCR mediante ARNi. Dichos autores han informado que 8 de los 26 genes diana que fueron sometidas a ensayo no fueron capaces de proveer ninguna mortalidad experimentalmente significativa contra la plaga de los coleópteros bajo concentraciones de iARN (por ejemplo, dsARN) muy elevadas, superiores a 520 ng/cm².

Los autores de la patente de Estados Unidos N°. 7,612,194 y de la publicación de patente de Estados Unidos N°. 2007/0050860 presentaron el primer informe de ARNi *in planta* en plantas de maíz que apuntaban contra el gusano de las raíces del maíz de occidente. Baum *et al.* (2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-6. Estos autores describen un elevado rendimiento en el sistema de ARNi dietario *in vivo* para seleccionar potenciales genes diana para desarrollar maíz ARNi transgénico. De un agrupamiento de genes inicial de 290 dianas, solamente 14 presentaron un control potencial de las larvas. Uno de los ARN dobles (dsARN, por sus siglas en inglés) etiquetado a un gen que codifica la subunidad A de ATPasa ((V-ATPasa, por

sus siglas en inglés), resultando una rápida supresión del correspondiente mRNA endógeno y desencadenándose una respuesta ARNi específica con bajas concentraciones de dsARN. Por lo tanto, dichos autores han documentado por primera vez el potencial de los ARNi *in planta* como una posible herramienta para el control de una plaga, demostrándose al mismo tiempo que de por sí no era posible identificar exactamente los dianas efectivos, ni siquiera a partir de un conjunto relativamente pequeño de genes candidato.

Otra aplicación potencial de ARNi para el control de los insectos implica el ARNi parental (pRNAi, por sus siglas en inglés). Primero descrito en *Caenorhabditis elegans*, se identificó el pARNi mediante inyección de dsARN en la cavidad corporal (o aplicación de dsARN vía ingestión), causando una inactivación de los genes en los embriones descendientes. Fire *et al.* (1998), *supra*; Timmons y Fire (1998) Nature 395(6705):854. Se describió un proceso similar en el modelo coleóptero, *Tribolium castaneum*, en el que unas crisálidas hembra en las que se había inyectado dsARN correspondiente a tres genes únicos en su género que controlan la segmentación durante el desarrollo embrionario tuvieron como resultado la atenuación de genes cigóticos en los embriones descendientes. Bucher *et al.* (2002) Curr. Biol. 12(3):R85-6. En este estudio, prácticamente la totalidad de las larvas descendientes presentaron fenotipos específicos para genes, una semana después de la inyección. Si bien la inyección de dsARN para estudios genómicos funcionales ha tenido éxito en una

variedad de insectos, la captación de dsARN desde el entorno intestinal por medio de exposición oral al dsARN y subsiguiente regulación descendente de genes esenciales se requiere para que el ARNi sea efectivo como una herramienta para el control de las plagas. Auer y Frederick (2009) Trends Biotechnol. 27(11):644-51.

Se ha utilizado el ARNi parental para describir la función de los genes embrionarios en una cantidad de insectos de especie, incluyéndose el colémbolo, *Orchesella cincta* (Konopova y Akam (2014) Evodevo 5(1):2); el saltamontes verde de las plantas, *Nilaparvata lugens*; la sírice, *Athalia rosae* (Yoshiyama *et al.* (2013) J. Insect Physiol. 59(4):400-7); la cucaracha alemana; *Blattella germanica* (Piulachs *et al.* (2010) Insect Biochem. Mol. Biol. 40:468-75); y el áfido de las lentejas, *Acyrtosiphon pisum* (Mao *et al.* (2013) Arch Insect Biochem Physiol 84(4):209-21). La respuesta de pARNi en todos estos casos se logró mediante la inserción de dsARN en el hemocoele del genitor hembra.

Descripción de la invención

En la presente se divulgan moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, genes diana, ADN, dsARN, siARN, miARN, shARN, y hpARN), y métodos para su utilización, para el control de plagas de coleópteros, que incluyen, por ejemplo *D. v. virgifera* LeConte (gusano occidental de las raíces del maíz, “WCR”, por sus siglas en inglés); *D. barberi* Smith y Lawrence (gusano norteno de las raíces del maíz, “NCR”, por sus siglas en inglés); *D. u. howardi* Barber (gusano sureño de las raíces del maíz, “SCR”, por sus siglas en

inglés); *D. v. zea* Krysan y Smith (gusano mexicano de las raíces del maíz, “MCR”, por sus siglas en inglés); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. speciosa* Gennar, y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim. En ejemplos particulares, se divulgan ejemplos de moléculas de ácido nucleico que pueden ser homólogas con respecto a por lo menos una porción de uno o más ácidos nucleicos en una plaga de coleópteros. En algunas modalidades, las plagas de coleópteros se controlan reduciendo la capacidad de una generación existente para producir una generación subsiguiente de la plaga. En determinados ejemplos, el suministro de moléculas de ácido nucleico a plagas de coleópteros no tiene como resultado una mortalidad significativa de los animales de plaga, pero reduce el número de prole viable producida a partir de ellos.

En estos ejemplos y en otros, la molécula de ácido nucleico nativa puede ser un gen diana, cuyo producto puede por ejemplo, y sin limitación: intervenir en un proceso metabólico, que interviene en un proceso reproductivo; y/o intervenir en un desarrollo embrionario y/o larvario. En algunos ejemplos, la inhibición postraslacional de la expresión de un gen diana por una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido homólogo con respecto a éste, puede tener como resultado una reducción en la viabilidad, desarrollo y/o reproducción de la plaga de coleópteros. En ejemplos específicos, se selecciona un gen *hunchback* como gen diana para el silenciamiento postranscripcional. En ejemplos específicos, un gen diana útil para la inhibición postranscripcional es el novedoso gen que en la presente

lleva la denominación *Diabrotica hunchback* (SEC ID NO:1). Por lo tanto, en la presente se divulga una molécula aislada de ácido nucleico que comprende el polinucleótido de la SEC ID NO:1, el complemento de la SEC ID:1 y/o fragmentos de cualquiera de los precedentes (por ejemplo, las SEC ID NOs: 3 y 67).

También se divulgan moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de por lo menos aproximadamente el 85% con respecto a una secuencia de aminoácidos dentro de un producto génico diana (por ejemplo, el producto de un gen *hunchback*). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de por lo menos el 85% con respecto a la SEC ID NO:2 (*Diabrotica* HUNCHBACK); y/o una secuencia de aminoácidos dentro de un producto de *Diabrotica hunchback*. También se divulgan moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que es el complemento inverso de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de por lo menos el 85% con respecto a una secuencia de aminoácidos dentro de un producto génico diana.

También se divulgan polinucleótidos cADN que pueden ser útiles para la producción de moléculas de iARN (por ejemplo, dsARN, siARN, shARN, miARN, y hpARN) que son complementarias con respecto a la totalidad o parte de un gen diana de plagas de coleópteros, por ejemplo: un gen *hunchback*. En modalidades particulares, los dsARN, siARN, shARN, miARN y/o hpARN pueden

producirse *in vitro*, o *in vivo* mediante un organismo genéticamente modificado, tal como una planta o bacteria. En ejemplos particulares, se divulgan moléculas de cADN que pueden utilizarse para producir moléculas de iARN que son complementarias con respecto a todo o
5 parte de mRNA transcrito a partir de *Diabrotica hunchback* (SEC ID NO:1).

También se divulgan medios para inhibir la expresión de un gen diana en una plaga de coleópteros, y medios para proteger una planta contra una plaga de coleópteros. Un medio para inhibir la
10 expresión de un gen diana en una plaga de coleópteros es una molécula de ARN de cadena simple o doble consistente en un polinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en la SEC ID NO:70, SEC ID NO: 71, SEC ID NO:72, y sus complementos. Los equivalentes funcionales de medios para inhibir la expresión de un
15 gen diana en una plaga de coleópteros incluyen moléculas de ARN de cadena simple o doble que son sustancialmente homólogas con respecto a la totalidad o parte de un ARN transcrito de un gen de WCR que comprende la SEC ID NO: 1. Un medio para proteger una planta contra una plaga de coleópteros es una molécula de ADN que
20 comprende un polinucleótido que codifica un medio para inhibir la expresión de un gen diana en una plaga de coleópteros, operativamente ligado a un promotor, en donde la molécula de ADN tiene la capacidad de ser integrada en el genoma de una planta de maíz.

25 Se divulgan métodos para controlar una población de una plaga

de coleópteros, que comprende proveer a una plaga de coleópteros una molécula de iARN (por ejemplo, dsARN, siARN, shARN, miARN, y hpARN) que al ser incorporada por la plaga funciona de manera de inhibir una función biológica dentro de la plaga, en donde la

5 molécula de iARN comprende la totalidad o una parte de (por ejemplo, por lo menos 15 nucleótidos contiguos de) un polinucleótido seleccionado de entre un grupo que consiste en: la SEC ID NO:1; el complemento de la SEC ID NO:1; la SEC ID NO:3; el complemento de la SEC ID NO:3; la SEC ID NO:67; el complemento de la SEC ID

10 NO:67; un polinucleótido codificador nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende la totalidad o parte de la SEC ID NO:1, de la SEC ID NO:3 y/o de la SEC ID NO:67; el complemento de un polinucleótido codificador nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la totalidad o una parte de la

15 SEC ID NO:1, de la SEC ID NO:3 y/o de la SEC ID NO:67; un polinucleótido nativo no codificador de un organismo *Diabrotica* que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende la totalidad o una parte de la SEC ID NO:1, de la SEC ID NO:3 y/o de la SEC ID NO:67; y el complemento de un polinucleótido nativo no

20 codificador de un organismo *Diabrotica* que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende la totalidad o una parte de la SEC ID NO:1, de la SEC ID NO:3 y/o de la SEC ID NO:67.

En ejemplos particulares, se divulgan métodos para controlar una población de una plaga de coleópteros, que comprende proveer

25 a una plaga de coleópteros en una molécula de iARN (por ejemplo,

dsARN, siARN, shARN, miARN, y hpARN) que al ser incorporada en la plaga funciona de manera de inhibir una función biológica dentro de la plaga, en donde la molécula de iARN comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: la totalidad o
 5 parte de la SEC ID NO:70; el complemento de la totalidad o parte de la SEC ID NO:70; de la SEC ID NO:71; el complemento de la SEC ID NO:71; de la SEC ID NO:73; y el complemento de la SEC ID NO:73; un polinucleótido que hibrida a un polinucleótido nativo codificador de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende la
 10 totalidad o una parte de cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3 y/o 67; el complemento de un polinucleótido que hibrida a un polinucleótido nativo codificador de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende la totalidad o una parte de cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3 y/o 67.

15 En la presente también se divulgan métodos en los que los dsARN, siARN, shARN, miARN y/o hpRNA puede ser provistos a una plaga de coleópteros en un ensayo basado en una dieta, o en células de plantas genéticamente modificadas que expresan los dsARN, siARN, shARN, miARN y/o hpARN. En estos ejemplos, y en otros, los
 20 dsARN, siARN, shARN, miARN y/o hpARN, pueden ser ingeridos por una plaga de coleópteros. La ingesta de los dsARN, siARN, shARN, miARN y/o hpARN de la invención puede seguidamente tener como resultado la presencia de ARNi en la plaga, lo que a su vez puede tener como resultado el silenciamiento de un gen diana para un
 25 proceso metabólico; un proceso reproductivo; y/o un desarrollo

larvario. Por lo tanto, se divulgan métodos en los que a una plaga de coleópteros se le proveen moléculas de ácido nucleico que comprenden uno o más ejemplos de polinucleótidos útiles para el control parental de plagas de coleópteros. En ejemplos particulares, la plaga de coleópteros controlada mediante el uso de moléculas de ácido nucleico de la inversión puede ser WCR, NCR o SCR. En algunos ejemplos, la entrega de moléculas de ácido nucleico a las plagas de coleópteros no tiene como resultado una mortalidad significativa entre las plagas, pero reduce el número de progenie producida a partir de ellas. En algunos ejemplos, la entrega de moléculas de ácido nucleico a una plaga de coleópteros tiene como resultado una mortalidad significativa en las plagas, y también reduce el número de progenie viable producida a partir de ellas.

Los rasgos precedentes y otros, serán puestos en mayor evidencia en base a la siguiente descripción detallada de varias modalidades, y en la que se hace referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Las **figuras 1A-1B** incluyen una ilustración de la estrategia utilizada para generar dsARN a partir de una plantilla de transcripción simple con un único par de cebadores (**figura 1A**) y a partir de dos plantillas de transcripción (**figura 1B**).

La **figura 2** incluye una ilustración de la organización del dominio de las secuencias de proteína de *HUNCHBACK* de *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum*, y *Diabrotica virgifera virgifera*. Las proteínas HUNCHBACK de *D. melanogaster*, *T.*

castaneum, y *D. v. virgifera* HUNCHBACK contienen seis dedos de zinc de tipo C2H2, indicados mediante la base de datos SMART.

Las **figuras 3A-3B** incluyen un resumen de datos que muestra los efectos de dsARN particulares sobre la producción y viabilidad de huevos de WCR. Se ilustra la cantidad de huevos ovidepositados por hembra WRC adulta (**figura 3A**), y el porcentaje de huevos que eclosionaron (**figura 3B**). Los datos son más/menos el SEM. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí ($P > 0.05$, $N = 6$).

Las **figuras 4A-4B** incluye fotografías representativas de huevos de WCR disecados para examinar el desarrollo embrionario bajo diferentes condiciones experimentales. Los huevos que fueron depositados por hembras tratadas con GFP dsARN (**figura 4A**) mostraron un desarrollo normal. Los huevos depositados por hembras tratadas con dsARN *hunchback* (**figuras 4A-4B**) muestran un desarrollo embrionario incompleto y larvas malformadas.

Las **figuras 5A-5D** incluyen un resumen de datos que muestra la expresión relativa de *hunchback* en huevos recolectados de hembras de WCR que habían sido expuestas a dsARN en una dieta artificial tratada, en comparación con GFP y controles de agua (**figura 5A**). También se muestra la expresión relativa de *hunchback* en hembras adultas que habían sido expuestas a una dieta artificial tratada, en comparación con GFP y controles de agua (**figura 5B**), en larvas expuestas a dsARN en una dieta artificial tratada, en comparación con GFP y controles de agua (**figura 5C**), y en machos

adultos que habían sido expuestos a dsARN una dieta artificial tratada, en comparación con GFP y controles de agua (**figura 5D**). Las barras seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes ($P > 0.05$; $N = 3$ replicaciones biológicas de 10 huevos o larvas/replicación 10 con dos replicaciones técnicas/muestra).

La **figura 6** incluye un resumen de datos de modelación que muestra el efecto de la magnitud relativa de un efecto de pARNi sobre ejemplares adultos hembra de WCR emergentes de un “parche de refugio” (es decir, que no expresaban iARNs insecticidas ni proteínas recombinantes en una planta de cultivo transgénica) sobre el coeficiente de incrementos de frecuencias alélicas en cuanto a la resistencia contra una proteína insecticida (R) y ARNi (Y) cuando las plantas no refugio expresan la proteína insecticida e iARN parental activo.

La **figura 7** incluye un resumen de datos de modelación que muestra el efecto de la magnitud relativa de un efecto de pARNi sobre ejemplares adultos hembra de WCR emergentes de un “parche de refugio” (es decir, que no expresaban iARNs insecticidas ni proteínas recombinantes en un cultivo de plantas transgénicas que comprenden dsARN que interfiere de manera activa sobre larvas de las raíces del maíz en combinación con la proteína insecticida activa sobre el gusano de las raíces del maíz en la planta de cultivo transgénica) sobre el coeficiente de incrementos de frecuencias alélicas en cuanto a la resistencia contra una proteína insecticida (R) y ARNi (Y) cuando las plantas no refugio expresan la proteína

insecticida y moléculas de iARN activas tanto sobre las larvas y los genitores.

La **figura 8A** ilustra un resumen de datos que muestra el número de huevos recuperados por hembra y la **figura 8B** ilustra resultados del porcentaje total de larvas que eclosionaron, respectivamente, después de su exposición a 0.67 µg/µl de *hunchback* o a GFP seis veces antes de aparearse, y seis veces a los 6 días después de aparearse. Comparaciones efectuadas con la prueba de Dunnett, * indica una significancia a $p < 0.1$, ** indica una significancia a $p < 0.05$, *** indica una significancia a $p < 0.001$.

La **figura 9** ilustra un resumen de datos que muestra la expresión relativa del *hunchback* medida después de una exposición a 0.67 µg/µl de *hunchback* o a GFP seis veces antes de aparearse, 6 seis veces inmediatamente después de aparearse, y 6 veces después de aparearse. Las comparaciones fueron efectuadas con la prueba de Dunnett, ** indica una significancia a $p < 0.05$, *** indica una significancia a $p < 0.001$.

Las figuras **10A-10C** ilustran la duración de los efectos de la exposición relacionado con la respuesta de pARNi utilizando *hunchback* dsARN en *D. v. virgifera*. Unas hembras alimentadas con dieta tratada con dsARN; T indica la cantidad de veces que las hembras recibieron dsARN (0.67 µg/µl), de una dieta provista cada dos días a lo largo de 12 días. La **figura 10A**. Oviposición: huevos recolectados de hembras alimentadas con dsARN, huevos recolectados después de la última exposición de alimentación. La

figura 10B: porcentaje de eclosión: huevos eclosionados sobre la base de los números ovidepositados en **10A**. La **figura 10C;** expresión relativa de transcripción de *hunchback* en función de la duración de la exposición. Las comparaciones fueron efectuadas con la prueba de Dunnett, * indica una significancia a $p < 0.05$. ** indica una significancia a $p < 0.001$.

La **figura 11** muestra la transcripción relativa de *hunchback* en hembras de *D. v. virgifera* en base a la respuesta a la concentración. Las comparaciones fueron efectuadas con la prueba de Dunnett, ** indica una significancia a $p < 0.05$, *** indica una significancia a $p < 0.001$.

Listado de secuencias

Las secuencias de ácido nucleico enumeradas en el siguiente listado de secuencias adjunto se muestran mediante abreviaturas de letras estándar para bases de nucleótidos, tal como se define en 37 C.F.R. & 1.822. Las secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos listados definen moléculas (es decir, polinucleótidos y polipéptidos, respectivamente) que tienen los monómeros de nucleótidos y de aminoácidos dispuestos de la manera descrita. Las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos listados también definen, cada una de ellas, un género de polinucleótidos o de polipéptidos que comprenden monómeros de nucleótidos y de aminoácidos dispuestos de la manera descrita. En vista de la redundancia del código genético, debe entenderse que una secuencia de nucleótidos que incluye una secuencia de

codificación también describe el género de polinucleótidos que codifican el mismo polipéptido que un polipéptido consistente en la secuencia de referencia. Además, debe entenderse que una secuencia de aminoácidos describe el género de los OFR de polinucleótidos que codifica dicho polipéptido.

Se muestra solamente una cadena de cada secuencia de ácidos nucleicos, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida mediante cualquier referencia a la cadena visualizada. Dado que el complemento y el complemento inverso de una secuencia de ácido nucleicos primaria son necesariamente divulgados por la secuencia primaria, la secuencia complementaria y la secuencia complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos están incluidas mediante cualquier referencia a la secuencia de ácidos nucleicos, a menos que explícitamente se declare otra cosa (o sea evidente o que se desprenda del contexto en el que aparece la secuencia). Por otra parte, como se comprende en la especialidad que la secuencia de nucleótidos de una cadena de ARN es determinada por la secuencia del ADN desde el que fue transcrita (pero para la sustitución de nucleobases de uracilo (U) por timina (T)), se incluye una secuencia de ARN mediante cualquier referencia a la secuencia de ADN que lo codifica. En el listado de secuencias adjunto:

La SEC ID NO:1 muestra un cóntigo que comprende un ejemplo de ADN de *Diabrotica hunchback*:

GTTAGATAGTGGTGGTCACATGACATTGTTATCAGTGATTTTAATAC

GTGTTTTTGGAGGAATGAAAATAATAGTTGGATTATTTCTAATACAGAC
 TTTGATTCTTACCGTGAAATGAGAGGAGGTGTTTCTGACGATATGAC
 TTCAACTTGCGTTCAAGGAGGAATTAGACCAATTGGACGATATCAAC
 CAAACATGCTTATGGAACCATCGTCTCCTCAATCTGCCTGGCAGTTT
 5 CACCCAGCCATGCCGAAACGAGAACCCGTCGATCATGATGGCAGAA
 ATGACTCCGGCTTAGCATCTGGAGGTGAATTTATTTTCATCTTCACCA
 GGAAGTGACAATAGTGAACACTTCAGCGCTTCCTATTCATCTCCAAC
 CAGTTGCCATACAGTAATTTCTACTAATACTTATTATCCCACCAATCT
 AAGAAGACCTTCACAGGCGCAGACGAGTATTCCAACGCACATGATG
 10 TACACCGGCGATCACAACCCCTTAACTCCCCCGAATTCGGAACCTAT
 GATTTGCCCCAAAAGCGTGTTATCAAGAAACAACGAAGGTGAACATC
 AACTACTCTGACGCCTTGTGCGTCTCCTGAGGATGCTTCTGTTGAT
 GCTACAGACAGCGTTAATTGCGACGGTGCTTTAAAAAAATTACAAGC
 GACTTTTGAAAAAAATGCTTTTAGTGAAGGTTCTGGGGATGACGATA
 15 CCAAATCTGATGGAGAGGCAGAAGAATACGACGAACAAGGACTAAG
 AGTTCCAAAAGTTAACTCTCATGGAAAAATTAAACTTTCAAGTGTA
 GCAATGTGATTTTGTGGCCATTACTAACTAGTCTTCTGGGAACATA
 CCAAGTTACATATTAAAGCTGACAACTCCTTAAATGCCCAAGTGT
 CCTTTTGTCACCGAATATAAGCACCATTTAGAATATCACCTTAGAAAT
 20 CATTATGGTTCAAACCATTTAAATGTAACCAGTGTTAGTTACTCTTGT
 GTAAACAAATCAATGCTTAATTCACATTTAAATCTCACTCTAATATTT
 ACCAATACCGCTGTTCTGACTGCAGTTATGCCACAAAATATTGTCAT
 TCGCTGAAATTGCATCTTAGAAAATACTCGCACAAACCTGCTATGGT
 ACTAAACCCAGATGGAACACCAAATCCGTTGCCATAATCGATGTTT
 25 ATGGTACAAGGAGAGGACCAAAGATGAAGTCAGAACAAAAATCATCT

GAGGAAATGTCTCCGAAACCCGAACAAGTTCTACCATTCCCATTAA
 CCAGTTTCTACCCCAAATGCAGTTACCATTCCCAGGATTTCCATTATT
 TGGAGGTTTTCCAGGTGGCATTCCAAATCCTTTGTTATTGCAAACT
 TGGAAAACTAGCCCGAGAAAGGCGTGAATCCATGAACTCTTCAGA
 5 ACGTTTTTCTCCCGCACAATCAGAACAAATGGATACCGATGCAGGCG
 TTCTTGATCTCAGTAAACCAGATGACTCTTCCCAGACAAACCGACGA
 AAAGATTCAGCTTACAACTTTCAACTGGTGATAATTCTTCAGATGAA
 GAAGACGATGAGGCAACTACAACAATGTTCCGGTAATGTTGAAGTTGT
 TGAAAATAAAGAACTAGAAGATACTTCATCGGGGAAACAGACACCAA
 10 CTAGTGCTAAAAAGGATGACTACTCGTGCCAATACTGTCAGATAAAT
 TTCGGGGACCCCGTTTTGTATACTATGCATATGGGTTACCACGGATA
 CAAGAATCCATTTATTTGCAACATGTGCGGTGAGGAATGTAATGATA
 AAGTGTCTTTCTTCTTGACATTGCACGAAATCCTCATTCTTAAAAAT
 ATCAATAAGACTGAATTCAAGGTTAGCATTTTTATATATTATATTAC
 15 ACTGAACTTTTTTAATATTCAATATTTGGTTGCGTAACATTTACGCA
 TATCTATACTTTATTTACG

La SEC ID NO:2 muestra la secuencia de aminoácidos de un
 polipéptido de *Diabrotica* HUNCHBACK codificado por un ejemplo de
 ADN de *Diabrotica hunchback*:

20 MRGGVSDDMTSTCVQGGIRPIGRYQPNMLMEPSSPQSAWQFHPAMP
 KREPVDHDGRNDSGLASGGEFISSPGSDNSEHFSASYSSPTSCHTVI
 STNTYYPTNLRRPSQAQTSIPTHMMYTGDHNPLTPPNSEPMISPKSVL
 SRNNEGEHQTTLTPCASPEDASVDATDSVNCDGALKKLQATFEKNAFS
 EGSGDDDTKSDGEAEEYDEQGLRVPKVNSHGKIKTFKCKQCDFVAITK
 25 LVFWEHTKLHIKADKLLKCPKCPFVTEYKHHLEYHLRNHYGSKPFCN

QCSYSCVKNKSMNLNSHLKSHSNIYQYRCSDCSYATKYCHSLKLHLRKYS
 HKPAMVLNPDGTPNPLPIIDVYGTRRGPKMKSEQKSSEEMSPKPEQVL
 PFPFNQFLPQMQLPFPGFPLFGGFPGGIPNPLLLQNLEKLARERRESM
 NSSERFSPAQSEQMDTDAGVLDLSKPDDSSQTNRRKDSAYKLSTGDN
 5 SSDEEDDEATTTMFGNVEVVENKELEDTS SGKQTPTS AKKDDYSCQY
 CQINFGDPVLYTMHMGYHGYKNPFICNMCGEECNDKVSFFLHIARNPH
 S

La SEC ID NO:3 muestra un ejemplo de ADN de *Diabrotica hunchback*, que en la presente recibe a veces la designación de
 10 *hunchback* Reg1, que se utiliza en algunos ejemplos para la
 producción de un dsARN:

AAGTGTAAGCAATGTGATTTTGTGGCCATTACTAACTAGTCTTCTG
 GGAACATACCAAGTTACATATTAAGCTGACAACTCCTTAAATGCC
 CCAAGTGTCCTTTTGTCAACGAATATAAGCACCATTTAGAAATATCAC
 15 CTTAGAAATCATTATGGTTCAAAACCATTAAATGTAACCAGTGTAGT
 TACTCTTGTGTAAACAAATCAATGCTTAATTCACATTTAAAATCTCAC
 TCTAATATTTACCAATACCGCTGTTCTGACTGCAGTTATGCCACAAAA
 TATTGTCATTGCTGAAATTGCATCTTAGAAAATACTCGCACAAACCT
 GCTATGGTACTAAACCCAGATGGAACACCAAATCCGTTGCCCATAT
 20 CGATGTTTATGGTACAAGGAGAGG

La SEC ID NO:4 muestra la secuencia de nucleótidos de un
 promotor de fago T7.

Las SEC ID NOs:5-8 muestran cebadores (lo que incluye el
 promotor T7 TAATACGACTCACTATAGGG para todos los cebadores)
 25 utilizados para amplificar regiones de un gen *Diabrotica hunchback* o

de un gen GFP.

La SEC ID NO:9 muestra un gen GFP.

La SEC ID NO:10 muestra un ejemplo gen YFP.

La SEC ID NO:11 muestra una secuencia de ADN de la región
5 1 de *annexina*.

La SEC ID NO:12 muestra una secuencia de ADN de la región
2 de *annexina*.

La SEC ID NO:13 muestra una secuencia de ADN de la región
1 de beta *espectrina 2*.

10 La SEC ID NO:14 muestra una secuencia de ADN de la región
2 de beta *espectrina 2*.

La SEC ID NO:15 muestra una secuencia de ADN de la región
1 de mtRP-L4.

La SEC ID NO:16 muestra una secuencia de ADN de la región
15 2 de mtRP-L4.

Las SEC ID NOs:17-44 muestran cebadores utilizados para
amplificar regiones gen de *annexina*, *beta espectrina 2*, *mtRP-L4*, e
YFP para la síntesis de dsARN.

La SEC ID NO:45 muestra ejemplo de ADN que comprende un
20 intrón ST-LS1.

La SEC ID NO:46 muestra un ejemplo de ADN que codifica un
ARN que forma *Diabrotica hunchback* v1 de horquilla, que contiene
polinucleótidos de sentido, y polinucleótido de bucle que incluye un
intrón (subrayado), y polinucleótido de antisentido (en negrita):

25 CAATACCGCTGTTCTGACTGCAGTTATGCCACAAAATATTGTCATTCGCTGAAATT

GCATCTTAGAAAATACTCGCACAAACCTGCTATGGTACTAAACCCAGATGGAACA
 CCAAATCCGTTGCCATAATCGATGTTTATGGTACAAGGAGAGGAGACTAGTACC
GGTTGGGAAAGGTATGTTTCTGCTTCTACCTTTGATATATATATAATAATTATCACT
AATTAGTAGTAATATAGTATTTCAAGTATTTTTTTCAAATAAAAGAATGTAGTATAT
 5 AGCTATTGCTTTTCTGTAGTTTATAAGTGTGTATATTTTAATTTATAACTTTTCTAAT
ATATGACCAAAACATGGTGATGTGCAGGTTGATCCGCGGTTATCCTCTCCTTGTA
CCATAAACATCGATTATGGGCAACGGATTTGGTGTTCCATCTGGGTTTAGTACC
ATAGCAGGTTTGTGCGAGTATTTTCTAAGATGCAATTCAGCGAATGACAATATT
TTGTGGCATAACTGCAGTCAGAACAGCGGTATTG

10 La SEC ID NO:47 muestra la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido cebador T20VN.

Las SEC ID NOs:48-52 muestra cebadores y sondas utilizados para el análisis de la expresión de transcritos de dsARN.

15 La SEC ID NO:53 muestra una secuencia de nucleótidos de una porción de una región de codificación SpecR utilizada para la detección de la estructura principal de un vector binario.

La SEC ID NO:54 muestra una secuencia de nucleótidos de una región de codificación *AAD1* utilizada para el análisis del número de copias genómicas.

20 Las SEC ID NOs:55-66 muestra la secuencia de nucleótidos de oligonucleótidos de ADN utilizados para las determinaciones del número de copias de los genes y para la detección de la estructura principal de los vectores binarios.

25 La SEC ID NO:67 muestra un ejemplo de ADN de *Diabrotica hunchback* (v1), utilizado en algunos ejemplos para la producción de

un dsARN:

CAATACCGCTGTTCTGACTGCAGTTATGCCACAAAATATTGTCATTC
 GCTGAAATTGCATCTTAGAAAATACTCGCACAAACCTGCTATGGTAC
 TAAACCCAGATGGAACACCAAATCCGTTGCCCATTAATCGATGTTTAT
 5 GGTACAAGGAGAGGA

Las SEC ID NOs:68 y 69 muestran cebadores utilizados para la amplificación por PCR de una secuencia de *hunchback* v1, utilizada en algunos ejemplos para la producción de dsARN.

Las SEC ID NOs:70-73 muestran ejemplos de ARN transcritos
 10 de ácidos nucleicos que comprenden ejemplos de polinucleótidos de *hunchback* y de sus fragmentos.

Modos para llevar la invención a la práctica

I. Revisión de varias modalidades

Hemos desarrollado la interferencia de ARN (ARNi, por sus
 15 siglas en inglés) como una herramienta para el control de las plagas de insectos, utilizando una de las especies de insectos diana más probables para plantas transgénicas que expresan dsARN; el gusano occidental de las raíces del maíz. Hasta ahora, la mayoría de los genes propuestos como dianas para el ARNi no logran su propósito,
 20 y aquellas dianas útiles que han sido identificadas implican aquellas que causan la mayor letalidad en la fase larval. En la presente describimos la atenuación mediada de ARNi, del *hunchback* (*hb*) en el gusano occidental de las raíces del maíz, del que se ha comprobado que perturba el desarrollo embrionario cuando, por
 25 ejemplo las moléculas de iARN son administradas mediante dsARN

hunchback a hembras adultas. La exposición de insectos hembra adultos a dsARN *hunchback* no afectó la longevidad de los adultos cuando se lo administró oralmente. Sin embargo, hubo una ausencia casi completa de huevos recolectados de hembras que habían sido expuestas al dsARN *hunchback*. En algunas modalidades de la presente, la capacidad de entregar el dsARN *hunchback* por medio de alimentación a insectos adultos, confiere un efecto de pARNi que es muy útil para el control de plagas de insectos ((por ejemplo, coleópteros). Por otra parte, la capacidad potencial de implementar múltiples secuencias diana en las los gusanos de raíz tanto larvarios como adultos, puede aumentar las oportunidades de desarrollar procesos sostenibles para el control de las plagas e insectos en el que interviene tecnologías de ARNi.

En la presente se divulgan métodos y composiciones para el control genético de infestaciones de plagas de coleópteros. También se proveen métodos para identificar uno o más genes que son esenciales para el ciclo de vida de una plaga de coleópteros, para ser utilizado como un gen diana para el control, mediado por ARNi, de una población de plagas de coleópteros. Los vectores plásmidos de ADN que codifican una molécula de ARN pueden ser diseñados para suprimir uno o más genes diana que son esenciales para el crecimiento, supervivencia y/o desarrollo. En algunas modalidades, la molécula de ARN puede ser capaz de formar moléculas de dsARN. En algunas modalidades, se proveen métodos para la represión postranscripcional de la expresión o inhibición de un gen diana por

intermedio de moléculas de ácido nucleico que son complementarias con respecto a una región, codificadora o no codificadora, del gen diana en una plaga de coleópteros. En estas modalidades y en otras, una plaga de coleópteros puede ingerir una o más moléculas de dsARN, siARN, shARN, miARN y/o hpARN transcritas a partir de la totalidad o de una porción de una molécula de ácido nucleico que es complementaria con respecto a una secuencia, codificadora o no, de un gen diana, con lo cual se provee un efecto fitoprotector.

Algunas modalidades implican la inhibición, específica para secuencia, de la expresión de productos gen diana, utilizándose dsARN, siARN, shARN, miARN y/o hpARN que es complementaria con respecto a secuencias codificadoras y/o no codificadoras del o de los genes diana para lograr un control por lo menos parcial de una plaga de coleópteros. Se divulga un conjunto de moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas que comprenden un polinucleótido, por ejemplo, indicado en la SEC ID NO:1, y en sus fragmentos. En algunas modalidades, una molécula de dsARN estabilizada puede ser expresada a partir de estos polinucleótidos, sus fragmentos, o un gen que comprende uno de estos polinucleótidos, para el silenciamiento o inhibición postranscripcionales de un gen diana. En determinadas modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden la totalidad o una parte de las SEC ID NO:1, 3 y 67.

Algunas modalidades implican una célula hospedadora recombinante (por ejemplo, una célula de planta) que en su genoma

tenga por lo menos un ADN recombinante que codifique por lo menos una molécula de iARN (por ejemplo, dsARN). En modalidades particulares, la o las moléculas de dsARN pueden producirse cuando son ingeridos por una plaga de coleópteros para silenciar o inhibir postranscripcionalmente la expresión de un gen diana en la plaga o en una progenie de la plaga. El ADN recombinante puede comprender, por ejemplo, cualquiera de las siguientes: las SEC ID NOs 1, 3 y 67; fragmentos de cualquiera de las SEC ID NOs 1, 3 y 67; y un polinucleótido consistente en una secuencia parcial de un gen que comprende una o más de las siguientes: SEC ID NOs 1, 3 y 67: y/o sus complementos.

Algunas modalidades implican una célula hospedadora recombinante que tiene en su genoma un ADN recombinante que codifique por lo menos una molécula de iARN (por ejemplo, dsARN) que comprende la totalidad o una parte de la SEC ID NO: 70 (por ejemplo, por lo menos un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 70-73). Cuando son ingeridas por una plaga de coleópteros, la o las moléculas de iARN pueden silenciar o inhibir la expresión de un gen diana *hunchback* (por ejemplo, un ADN que comprende la totalidad o una parte de un polinucleótido seleccionado en el grupo que consiste en las SEC ID NOs: 1, 3 y 67) en la plaga o progenie de la plaga, y de esta manera obtener una cesación de la reproducción de la plaga y/o en el crecimiento, desarrollo y/o alimentación de la progenie de la plaga.

En otras modalidades, una célula hospedadora recombinante

que en su genoma tenga por lo menos un ADN recombinante que codifique por lo menos una molécula de ARN capaz de formar una molécula de dsARN, puede ser una célula de planta transformada. Algunas modalidades implican plantas transgénicas que comprenden una planta transgénica modificada de este tipo. Además de tales plantas transgénicas, también se provee la totalidad de las siguientes, plantas descendientes de cualquier generación de plantas transgénicas, semillas transgénicas, y productos de planta transgénicas, cada una de las cuales comprende uno o más ADN. En modalidades particulares, una molécula de ARN capaz de formar una molécula de dsARN puede ser expresada en una célula de planta transgénica. Por lo tanto, en esta modalidad y en otras, una molécula de dsARN puede ser aislada de una célula de planta transgénica. En modalidades particulares, la planta transgénica es una planta seleccionada del grupo que comprende maíz (*Zea mays*), soya (*Glycine max*), algodón, plantas de la familia de las *Poaceae*.

Algunas modalidades implican un método para modular la expresión de un gen diana en una célula de una plaga de coleópteros. En estas modalidades y en otras, puede proveerse una molécula de ácido nucleico, en donde la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de dsARN. En modalidades particulares, un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de dsARN puede estar cooperativamente ligado a un promotor, y también puede estar

operativamente ligado a una secuencia de terminación de transcripción. En modalidades particulares, un método para modular la expresión de un gen diana en una célula de plaga de coleóptero puede comprender: (a) transformar una célula de planta con un
5 vector que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de dsARN; (b) cultivar la célula de la planta transformada en condiciones que son suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo de células de planta que comprende una pluralidad de células de planta transformada; (c)
10 seleccionar una célula de planta transformada que ha integrado el vector en su genoma; y (d) determinar que la célula de planta transformada seleccionada comprende la molécula de ARN capaz de formar una molécula de dsARN codificada por el polinucleótido del vector. Puede regenerarse una planta partir de la célula de planta
15 que tiene el vector integrado en su genoma y que comprende la molécula de dsARN codificada por el polinucleótido del vector.

También se divulga una planta transgénica que comprende un vector que tiene un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de dsARN integrada en su genoma, en
20 donde la planta transgénica comprende la molécula de dsARN codificada por el polinucleótido del vector. En modalidades particulares, la expresión de una molécula de ARN capaz de formar una molécula de dsARN en la planta es suficiente para modular la expresión de un gen diana en una célula de una plaga de coleópteros
25 que entra en contacto con la planta transformada o con la célula de

planta transformada (por ejemplo, por el hecho de alimentarse de la planta transformada, de una parte de la planta ((por ejemplo, las raíces) o célula de la planta) o en una célula de una progenie de la plaga de coleópteros que entra en contacto con la planta transgénica o con la célula de planta (por ejemplo, por medio de transmisión parental), de manera tal que se inhibe la reproducción de la plaga. Las plantas transgénicas divulgadas en la presente pueden presentar una resistencia y/o tolerancia frente a las infestaciones de plagas de coleópteros. Plantas transgénicas específicos pueden presentar una protección y/o una protección reforzada contra una o más plagas de coleópteros seleccionados del grupo que consiste en: WCR; NCR; SCR; MCR; *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. speciosa* Germar; y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim.

En la presente también se proveen métodos para la entrega de agentes de control, tal como una molécula de iARN, a una plaga de coleópteros. Tales agentes de control pueden causar, de manera directa o indirecta, un deterioro en la capacidad de una población de insectos plaga para alimentarse, desarrollarse o de alguna otra manera causar un daño en un anfitrión. En algunas modalidades, se provee un método que comprende entregar una molécula de dsARN estabilizada a una plaga de coleópteros a efectos de suprimir por lo menos un gen diana en la plaga, con lo que se logra que el ARNi reduzca o elimine los daños infligidos por la plaga en un anfitrión de la plaga. En algunas modalidades, un método para inhibir la expresión de un gen diana en una plaga de coleópteros puede tener

como resultado la cesación de la reproducción en la plaga y/o en el crecimiento, desarrollo y/o alimentación en la progenie de la plaga. En algunas modalidades, el método puede reducir de manera significativa la magnitud de una generación subsiguiente de la plaga en una infestación, sin ocasionar directamente la mortalidad en la o las plagas que entren en contacto con la molécula de iARN. En algunas modalidades, el método permite reducir de manera significativa la extensión de una subsiguiente generación de la plaga en una infestación, teniendo también lugar una mortalidad del o de las plagas que entren en contacto con la molécula de iARN.

En algunas modalidades, se proveen composiciones (por ejemplo, una composición tópica) que comprenden una molécula de iARN (por ejemplo, dsARN) para ser utilizadas con plantas, animales y/o el entorno de una planta o animal a efectos de lograr la eliminación o reducción de una infestación por coleópteros plaga. En algunas modalidades, se proveen composiciones que incluyen una procariota que comprende un ADN que codifica una molécula de iARN; por ejemplo, una célula bacteriana transformada. En ejemplos particulares, una célula transformada de este tipo puede ser utilizada como una formulación pesticida convencional. En modalidades particulares, la composición puede ser una composición nutricional o fuente alimenticia a ser presentada a la plaga de coleópteros para que se alimente con ella. Algunas modalidades comprenden hacer que la composición nutricional o fuente alimenticia sea disponible para la plaga. La ingesta de una composición que comprende

moléculas de iARN puede tener como resultado la captación de las moléculas en una o más células de la plaga de coleópteros, lo que, a su vez, puede tener como resultado la inhibición de la expresión de por lo menos un gen diana en la o las células de la plaga o en su progenie. La ingesta de la planta o células de la planta, causante del daño, por una infestación de plagas de coleópteros puede limitarse o eliminarse en o sobre cualquier tejido del anfitrión o entorno en el que la plaga se halle presente, mediante la provisión de una más composiciones que comprenden una molécula de iARN en el anfitrión de la plaga.

Las composiciones y métodos divulgados en la presente pueden utilizarse conjuntamente en combinación con otros métodos y composiciones para controlar el daño infligido por la plaga de coleópteros. Por ejemplo, en la presente se describe una molécula de iARN destinada a proteger las plantas contra plaga de coleópteros que puede ser utilizada en un método que comprende el uso adicional de uno o más agentes que sean efectivos contra una plaga de coleópteros, bioplaguicidas que sean efectivos contra una plaga de coleópteros, rotación de cultivos, técnicas genéticas recombinantes que presentan rasgos distintos de los rasgos de los métodos mediados por ARNi y composiciones de ARNi (por ejemplo, toxinas *Bt*) y/o la expresión recombinante de moléculas de iARN no parentales (por ejemplo, moléculas de iARN letales que tiene como resultado la cesación del crecimiento, desarrollo y/o alimentación en la plaga de coleópteros que ingiera la molécula de iARN).

II. Abreviaturas

	dsARN	ácido ribonucleico de cadena doble
	GI	inhibición del crecimiento
	GFP	proteína fluorescente verde
5	NCBI	Centro Nacional de Información
	Bioteconológica	
	gADN	ácido desoxirribonucleico genómico, ADN genómico
	iARN	ácido ribonucleico inhibidor
10	ORF	marco de lectura abierto
	ARNi	interferencia de ácido ribonucleico
	miARN	ácido microrribonucleico
	siARN	ácido ribonucleico inhibidor pequeño
	hpARN	ácido ribonucleico de horquilla
15	shARN	ácido ribonucleico de horquilla pequeño
	pARNi	interferencia de ARN parental
	UTR	región no traducida
	WCR	gusano occidental de las raíces del maíz
	<i>(Diabrotica virgifera virgifera</i> LeConte)	
20	NCR	gusano nortño de las raíces del maíz
	<i>(Diabrotica barberi</i> Smith y Lawrence)	
	MCR	gusano mejicano de las raíces del maíz
	<i>(Diabrotica virgifera zea</i> Krysan y Smith)	
	PCR	reacción de polimerasa en cadena
25	qPCR	reacción cuantitativa de polimerasa en

cadena

RISC Complejo de Silenciamiento inducido por ARN

RH humedad relativa

SCR gusano sureño de las raíces del maíz

5 (*Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber)

SEM error estándar de la media

snARN ácido ribonucleico nuclear pequeño

YFP proteína fluorescente amarilla

III. Términos

10 En la siguiente descripción y tablas, se utiliza una cantidad de términos. A efectos de promover un entendimiento claro y constante de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, inclusive de los alcances a ser dados a tales términos, se proveen las siguientes definiciones:

15 Plaga de coleópteros: tal como se lo utiliza en la presente, la expresión “plaga de coleópteros” se refiere a insectos del orden de los coleópteros, inclusive los insectos plaga del género *Diabrotica*, que se alimentan de cultivos agrícolas y de productos de cultivo, inclusive maíz y otras gramíneas verdaderas. En ejemplos
20 particulares, una plaga de coleópteros se selecciona de una lista que comprende: *D. v. virgifera* LeConte (WCR); *D. barberi* Smith y Lawrence (NCR); *D. u. howardi* (SCR); *D. v. zea* (MCR); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; y *D. u. undecimpunctata Mannerheim*.

25 Contacto (con un organismo): Tal como se la utiliza en la presente, las expresiones “contacto con” o “captación” por un

organismo (por ejemplo, una plaga de coleópteros), con respecto a una molécula de ácido nucleico, incluye la internalización de la molécula de ácido nucleico en el organismo, por ejemplo y sin limitación: la ingesta de la molécula por el organismo (por ejemplo, mediante alimentación); el poner en contacto el organismo con una composición que comprende una molécula de ácido nucleico; y embeber el organismo con una solución que comprende la molécula de ácido nucleico.

Cóntigo: Tal como se utiliza en el presente, el término “cóntigo” se refiere a una secuencia de ADN que ha sido reconstruida a partir de un conjunto de segmentos de ADN superpuestos derivados de una única fuente genética.

Planta de maíz: tal como se la utiliza en la presente, la expresión “planta de maíz” se refiere a una planta de la especie *Zea mays* (maíz). En la presente, los términos “planta de maíz” y “maíz” se utilizan de manera intercambiable.

Expresión: Tal como se la utiliza en la presente, la “expresión” de un polinucleótido de codificación (por ejemplo, un gen o un transgén) se refiere al proceso mediante el que la información codificada de una unidad transcripción de ácido nucleico (lo que incluye, por ejemplo, gADN o cADN) es convertida en una parte operacional, no operacional o estructural de una célula, lo que frecuentemente incluye la síntesis de una proteína. La expresión de los genes puede ser influida por señales externas; por ejemplo, la exposición de una célula, tejido u organismo a un agente que

incremente o disminuya la expresión de los genes. La expresión de un gen también puede regularse en otra parte en la vía de ADN a ARN a proteína. La regulación de la expresión de los genes tiene lugar, por ejemplo, por medio de controles que actúan sobre la transcripción, traducción, transporte y procesamiento de ARN, la degradación de las moléculas intermediarias tales como mARN, o por medio de la activación, desactivación, compartimentalización, o degradación de moléculas de proteína específicas después de haber sido preparadas, o mediante combinaciones de estos. La expresión de los genes puede medirse a nivel de ARN o al nivel de las proteínas mediante cualquier método conocido en la especialidad, que incluyen, sin limitación transferencia de tipo Northern, RT-PCR, transferencia de tipo Southern, o uno o más ensayos de actividad de proteína *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*.

Material genético: Tal como se la utiliza en la presente, la expresión “material genético” incluye todos los genes y moléculas de ácido nucleico, tales como ADN y ARN.

Inhibición: Tal como se la utiliza en la presente, el término “inhibición”, cuando se la utiliza para describir un efecto sobre un polinucleótido de codificación (por ejemplo, un gen), se refiere a una disminución medible en el nivel celular mARN transcrito en el polinucleótido de codificación y/o péptido, polipéptido, o producto proteína del polinucleótido de codificación. En algunos ejemplos, la expresión de un polinucleótido de codificación puede ser inhibida de manera tal que se elimina aproximadamente la expresión. La

expresión “inhibición específica” se refiere a la inhibición de un polinucleótido de codificación diana sin afectar de manera consecuente la expresión de otros polinucleótidos de codificación (por ejemplo, genes) presentes en la célula en la que se está
5 llevando a cabo la inhibición específica.

Aislado: un componente biológico “aislado” (tal como un ácido nucleico o proteína) ha sido sustancialmente separado, producido por separación desde, o purificado a partir de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que se presenta
10 naturalmente el componente (es decir, otros ADN y ARN, cromosómicos y extracromosómicos, y proteínas), efectuándose al mismo tiempo un cambio químico o funcional en el componente (por ejemplo, es posible aislar un ácido nucleico de un cromosoma mediante la interrupción de los enlaces que conectan el ácido nucleico
15 al ADN restante en el cromosoma). Las moléculas de ácido nucleico y las proteínas que han sido aisladas incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas mediante métodos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante la expresión recombinante en una célula
20 hospedadora, como también las moléculas químicamente sintetizadas de ácido nucleico, proteínas, y péptidos.

Molécula de ácido nucleico: tal como se la utiliza en la presente, la expresión “molécula de ácido nucleico” puede referirse a una forma polimérica de nucleótidos, que pueden incluir cadenas
25 tanto de sentido como de antisentido de ARN, cADN, gADN, y formas

sintéticas y polímeros mixtos de los mencionados. Los términos “nucleótido” o “nucleobase” pueden referirse a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido, o a una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. La expresión “molécula de ácido nucleico” tal como se la
5 utiliza en la presente se utiliza como sinónimo de “ácido nucleico” y de “polinucleótido”. Una molécula de ácido nucleico tiene usualmente una longitud de por lo menos 10 bases, a menos que se especifique otra cosa. Por convención, la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico se lee desde el extremo 5' al extremo de
10 la molécula. El término “complemento” de una molécula de ácido nucleico se refiere a un polinucleótido que tiene nucleobases que pueden formar pares de bases con las nucleobases de la molécula de ácido nucleico (es decir, A-T/U, y G-C).

Algunas modalidades incluyen ácidos nucleicos que
15 comprenden un ADN plantilla que se transcribe en una molécula de ARN que es el complemento de una molécula de mRNA. En estas modalidades, el complemento del ácido nucleico transcrito en la molécula de mRNA se halla presente en la orientación de 5' a 3', por lo que la ARN polimerasa (que transcribe el ADN en la dirección de
20 5' a 3') transcribirá un ácido nucleico del complemento que puede hibridar en la molécula de mRNA. Por lo tanto, y a menos que específicamente se indique otra cosa, o que se desprenda del contexto, el término “complemento” se refiere a un polinucleótido que tiene nucleobases, de 5' a 3', que pueden formar pares de bases con
25 las nucleobases de un ácido nucleico de referencia. De manera

similar, y a menos que explícitamente se indique otra cosa (o que se desprendan del contexto), la expresión “complemento inverso” de un ácido nucleico se refiere al complemento de orientación inversa. Lo que precede se demuestra mediante la siguiente ilustración:

5	ATGATGATG	polinucleótido
	TACTACTAC	“complemento” del polinucleótido
	CATCATCAT	“complemento inverso” del polinucleótido

Algunas modalidades de la invención moléculas de iARN que forman ARN de horquilla. En estas iARN, tanto el complemento de un ácido nucleico a ser etiquetado por la interferencia de ARN como el complemento inverso pueden hallarse en la misma molécula, de manera tal que la molécula de ARN de una sola cadena puede ser “replegada” e hibridarse consigo misma sobre una región que comprende los polinucleótidos complementarios e inversamente complementarios.

Las “moléculas de ácido nucleico” incluyen todos los polinucleótidos, por ejemplo: formas de ADN de una sola cadena y de dos cadenas; formas de ARN de una sola cadena y formas de ARN doble (dsARN, por sus siglas en inglés). Las expresiones “secuencia de nucleótidos” o “secuencia de ácidos nucleicos” se refieren a las cadenas tanto de sentido como de antisentido de un ácido nucleico sea como cadenas individuales sea en el dúplex. La expresión “ácido ribonucleico” (ARN, por sus siglas en inglés) incluyen iARN (ARN inhibidor, dsARN (ARN doble), siARN (ARN de

interferencia pequeño), mRNA (ARN mensajero), miARN (micro-ARN), shARN (ARN de horquilla pequeño), hpARN (ARN de horquilla), tARN (ARNs de transferencia, cargados o descargados con el correspondiente aminoácido acilado), y cARN (ARN complementario). La expresión “ácido desoxirribonucleico” (ADN) incluye cADN, gADN, y los híbridos ADN-ARN. Las expresiones “polinucleótido”, “ácido nucleico” y sus “fragmentos” tal como entienden las personas expertas en la especialidad, incluyen por tanto gADN; ARN ribosomales, ARN de transferencia; ARN mensajeros; operones; y polinucleótidos diseñados más pequeños que codifican, o pueden estar adaptados para codificar, péptidos, polipéptidos, o proteínas.

Oligonucleótido: un oligonucleótido es un polímero de ácido nucleico breve. Los oligonucleótidos pueden formarse mediante la escisión de segmentos de ácido nucleicos más largos, o mediante la polimerización de precursores de nucleótidos individuales. Los sintetizadores automatizados permiten la síntesis de oligonucleótidos con una longitud de hasta varios centenares de bases. Dado que los oligonucleótidos pueden ligarse a un ácido nucleico complementario, se los puede utilizar como sondas para detectar ADN o ARN. Los oligonucleótidos compuestos de ADN (oligodeoxirribonucleótidos) pueden utilizarse en PCR, que es una técnica utilizada para la amplificación de secuencias de ADN y de ARN (inversamente transcritos en un cADN). En el PCR, el oligonucleótido recibe típicamente la denominación de “cebador”, que permite que una ADN

polimerasa extienda el polinucleótido y replique la cadena complementaria.

Una molécula de ácido nucleico puede incluir nucleótidos, tanto de presentación natural como modificados, ligados entre sí mediante
5 enlaces nucleotídicos de presentación natural o no natural. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar modificadas química o bioquímicamente, o pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivadas, como comprenderá fácilmente una persona experta en la técnica. Tales modificaciones incluyen por ejemplo,
10 etiquetas, metilación, sustitución de uno o más nucleótidos de presentación naturales por un análogo, modificaciones internucleótidas (por ejemplo, enlaces no cargados: por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.; enlaces cargados: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.;
15 partes pendientes: por ejemplo, péptidos; intercaladores: por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.; agentes de quelación; alquiladores; y enlaces modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). La expresión “molécula de ácido nucleico” también incluye toda conformación topológica, lo que incluye la
20 conformación de una sola cadena, doble, parcialmente en dúplex, en horquilla, circular, y de candado.

Tal como se las utiliza en la presente con respecto al ADN, las expresiones “secuencia de codificación”, “secuencia de nucleótidos estructural” o “molécula de ácido nucleico estructural” se refieren a
25 una secuencia de nucleótidos que en última instancia se transforma

en un polipéptido, vía transcripción y mARN, cuando se la coloca bajo el control de secuencias reguladoras adecuadas. Con respecto al ARN, la expresión “secuencia de codificación” se refiere a un polinucleótido que se traduce en un péptido, polipéptido, o proteína.

5 Los límites de una secuencia de un polinucleótido de codificación están determinados por un codón de inicio de traducción en el terminal 5' y por un codón de terminación de traducción en el terminal 3'. Los polinucleótidos de codificación incluyen, pero sin limitación: ADN genómico; cADN; EST; y polinucleótidos recombina-

10 ntes.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión “polinucleótido transcrito no codificador” se refiere a segmentos de moléculas de mARN tales como 5'UTR, 3'UTR y segmentos de intrón que no están traducidos en un péptido, polipéptido, o proteína.

15 Además, la expresión “polinucleótido transcrito no codificador” se refiere a un ácido nucleico que está transcrito en un ARN que funciona en la célula, por ejemplo, ARN estructurales (por ejemplo, ARN ribosomal (rARN, por sus siglas en inglés) ejemplificado por 5S rARN, 5.8S rARN, 16S rARN, 18S rARN, 23S rARN, y 28S rARN,

20 y similares); ARN de transferencia (tARN, por sus siglas en inglés); y snARN tales como U4, U5, U6, y similares. Los polinucleótidos transcritos no codificadores también incluyen por ejemplo y sin limitación, ARN pequeños (sARN, por sus siglas en inglés); este término se utiliza frecuentemente, para describir ARN bacterianos

25 pequeños no codificadores; ARN nucleolar pequeños (snoARN, por

sus siglas en inglés); microRNA; ARN pequeños de interferencia RNA (siARN, por sus siglas en inglés); ARN que interactúan con Piwi-(piAN); y ARN largos que no codifican. Más aun, la expresión “polinucleótido transcrito no codificador” se refiere a un polinucleótido
 5 que puede existir en estado nativo como un “ligador” intragénico en un ácido nucleico y que se transcribe en una molécula de ARN.

Interferencia de ARN letal: Tal como se la utiliza el presente, la expresión “interferencia de ARN letal” se refiere a una interferencia de ARN que tiene como resultado la muerte o pérdida de viabilidad
 10 del sujeto individual al que se entrega por ejemplo, un dsARN, miARN, siARN, shARN y/o hpARN.

Interferencia de ARN parental: Tal como se la utiliza el presente, la expresión “interferencia de ARN parental” (pARNi, por sus siglas en inglés) se refiere a un fenotipo de interferencia de
 15 ARN que puede observarse en la progenie del sujeto (por ejemplo, una plaga de coleópteros) al que se entrega, por ejemplo, un dsARN, miARN, siARN, shARN y/o hpARN. En algunas modalidades, el pARNi comprende la entrega de un dsARN a una plaga de coleópteros, en donde de esta manera se discapacita la plaga,
 20 impidiéndole engendrar una descendencia viable. Un ácido nucleico que inicie el pARNi puede incrementar, o no, la incidencia de la mortalidad en una población en la que se entrega el ácido nucleico. En determinados ejemplos, el ácido nucleico que inicia el pARNi no incrementa la incidencia de la mortalidad en la población a la que se
 25 entrega el ácido nucleico. Por ejemplo, es posible alimentar una

población de plagas de coleópteros con uno o más ácidos nucleicos que inicien pARNi, en donde las plagas sobreviven pero producen huevos que son menos capaces de hacer eclosionar una progenie viable que los huevos producidos por plagas de la misma especie que no han sido alimentados con el o los ácidos nucleicos. En un mecanismo de pARNi, el ARNi parental entregado a una hembra es capaz de atenuar la expresión cigótica en los embriones descendentes de la hembra. Bucher *et al.* (2002) Curr. Biol. 12(3):R85-6.

Genoma: Tal como se lo utiliza en la presente, el término “genoma” se refiere a ADN cromosómico hallado dentro del núcleo de una célula, y también se refiere a ADN de organela hallado en los componentes subcelulares de la célula. En algunas modalidades de la invención, es posible introducir una molécula de ADN en una célula de planta de manera tal que la molécula de ADN se integra en el genoma de la célula de planta. En estas modalidades y en otras, la molécula de ADN puede ser sea integrada en el ADN nuclear de la célula de planta, sea ser integrada en el ADN del cloroplasto o mitocondria de la célula de planta. El término “genoma”, tal como se aplica a las bacterias, se refiere tanto a los cromosomas como a los plásmidos dentro de la célula bacteriana. En algunas modalidades de la invención, es posible introducir una molécula de ADN en una bacteria de manera tal que la molécula de ADN se integra en el genoma de la bacteria. En estas modalidades y en otras, la molécula de ADN puede estar sea integrada sea cromosómicamente o estar

situada como en un plásmido estable.

Identidad de secuencias: La expresión “identidad de secuencias” o “identidad”, tal como se utilizan en la presente en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos, se refiere a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se las alinea para establecer la máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión “porcentaje de identidad de secuencias” puede referirse al porcentaje determinado mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas entre sí (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos) a lo largo de una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se presentan idénticos residuos de nucleótidos o de aminoácidos en ambas secuencias de manera de obtener el número de posiciones concordantes, dividiéndose el número de posiciones concordantes por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicándose el resultado por 100 de manera de obtener el porcentaje de identidad de secuencias. Se dice que una secuencia que es idéntica en cada posición en comparación con una secuencia de referencia tiene una identidad del 100% con

respecto a la secuencia de referencia, e inversamente.

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

El centro nacional de información biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST™; Altschul *et al.* (1990)) puede obtenerse de diversas fuentes, que incluyen el centro nacional de información biotecnológica (Bethesda, MD), y en Internet, para su utilización en conexión con diversos programas de análisis de secuencias. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencias mediante este programa puede encontrarse en Internet en el capítulo “ayuda” de BLAST™. Para comparaciones entre secuencias de ácido nucleico, puede utilizarse la función “secuencias de ayuda 2” del programa de BLAST™ (Blastn) utilizando el conjunto de matriz

BLOSUM62 de default para los parámetros de defecto. Cuando se las evalúa mediante este método, las secuencias de ácidos nucleicos con una similitud aun mayor con respecto a las secuencias de referencia mostrarán porcentajes de identidad crecientes.

5 Específicamente hibridable/específicamente complementario:
Tal como se las utiliza en la presente, las expresiones “específicamente hibridable” y “específicamente complementario” son términos que indican un grado suficiente de complementariedad de manera tal que tiene lugar una ligación estable y específica entre la
10 molécula de ácido nucleico y una molécula diana de ácido nucleico. La hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico implica la formación de una alineación antiparalela de las secuencias de ácido nucleico de las dos moléculas de ácido nucleico. Las dos moléculas son entonces capaces de formar enlaces de hidrógeno con
15 correspondiente bases en la cadena opuesta de manera de formar una molécula doble que, si es suficientemente estable, podrá ser detectada mediante métodos bien conocidos en la técnica. No es necesario que una molécula de ácido nucleico sea 100% complementaria con respecto a su secuencia diana para ser
20 específicamente hibridable. Sin embargo, el grado de complementariedad de secuencias que debe existir para que la hibridación sea específica, es una función de las condiciones de hibridación utilizadas.

Las condiciones de hibridación resultantes en grados
25 particulares de rigurosidad variarán en función de la naturaleza del

método de hibridación elegido y de la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico hibridantes. En términos generales, la temperatura de hibridación y la intensidad iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o de Mg^{++}) de la hibridación determinarán la rigurosidad de la hibridación. La intensidad iónica del tampón de lavado y la temperatura del lavado también influirán sobre la rigurosidad. Los cálculos en cuanto a las condiciones de hibridación requeridas para lograr los grados particulares de rigurosidad son bien conocidos de las personas expertas, y se exponen por ejemplo en: Sambrook *et al.* (ed.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, Capítulos 9 y 11, y actualizaciones; y Hames y Higgins (eds.) Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, 1985. Pueden encontrarse mayores instrucciones detalladas y guías con respecto a la hibridación de ácidos nucleicos en por ejemplo, en Tijssen, "Overview of principles of hybridation and the strategy of nucleic acid probe assays," en Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2, Elsevier, NY, 1993; y Ausubel *et al.*, Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2, Greene Publishing y Wiley-Interscience, NY, 1995.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "condiciones rigurosas" abarca las condiciones bajo las cuales tendrá lugar la hibridación solamente si hay una falta de concordancia inferior al 20% entre la secuencia de la molécula de hibridación y un

polinucleótido homólogo dentro de la molécula de ácido nucleico diana. La expresión “condiciones rigurosas” incluye además niveles particulares de rigurosidad. Por lo tanto, tal como se las utiliza en la presente, las condiciones de “rigurosidad moderada” son aquellas
5 bajo las cuales las moléculas con una falta de concordancia superior al 20% no se hibridarán; las condiciones de “elevada rigurosidad” son aquellas bajo las cuales las secuencias con una falta de concordancia superior a 10% no se hibridarán; y las condiciones de “rigurosidad muy elevada” son aquellas bajo las cuales las
10 secuencias con una falta de concordancia superior al 5% no se hibridarán.

Las siguientes son condiciones de hibridación representativa, no limitativa.

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

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

Condición de control no rigurosa (las secuencias que comparten una identidad de secuencias de por lo menos el 50% se hibridarán): hibridación en tampón 6x SSC a temperatura ambiente a 55 °C durante 16-20 horas; lavado dos veces en tampón 2x-3x SSC a temperatura ambiente o 55 °C durante 20-30 minutos cada vez.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión “sustancialmente homólogo” u “homología sustancial”, con respecto a un ácido nucleico, se refiere a un polinucleótido que tiene nucleobases contiguas que es hibridable en condiciones rigurosas con el ácido nucleico de referencia. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que son sustancialmente homólogos con respecto a un ácido nucleico de referencia de cualquiera de las SEC ID NO:1, 3, 46 y 76 son aquellos ácidos nucleicos que hibridan en condiciones rigurosas (por ejemplo, las condiciones de rigurosidad moderada establecidas con anterioridad), con respecto al ácido nucleico de cualquiera de las SEC ID NO: 1, 3, 46 y 76. Los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una identidad de secuencias de por lo menos el 80%. Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una intensidad de secuencias de aproximadamente 80% a 100%, tal como 79%; 80%; de aproximadamente 81%; de aproximadamente 82%; de aproximadamente 83%; de aproximadamente 84%; de aproximadamente 85%; de aproximadamente 86%; de aproximadamente 87%; de aproximadamente 88%; de aproximadamente 89%; de aproximadamente 90%; de

aproximadamente 91%; de aproximadamente 92%; de
aproximadamente 93%; de aproximadamente 94%; de
aproximadamente 95%; de aproximadamente 96%; de
aproximadamente 97%; de aproximadamente 98%; de
5 aproximadamente 98.5%; de aproximadamente 99%; de
aproximadamente 99.5%; y de aproximadamente 100%. La propiedad
de homología sustancial está estrechamente relacionada con la
hibridación específica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico
es específicamente hibridable cuando exista un grado suficiente de
10 complementariedad de manera de evitar la ligación no específica del
ácido nucleico a polinucleótidos no diana en condiciones en las que
se desea una ligación específica, por ejemplo, en condiciones de
hibridación rigurosas.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término “ortólogo” se
15 refiere a un gen en dos o más especies que ha evolucionado a partir
de un ácido nucleico ancestral en común, y que puede conservar la
misma función en las dos o más especies.

Tal como se utiliza en la presente, se dice que dos moléculas
de ácido nucleico presentan una “complementariedad completa”
20 cuando cada nucleótido de un oligonucleótido leído en la dirección
de 5' a 3' es complementario con respecto a cada nucleótido del otro
polinucleótido cuando se lee en la dirección de 3' a 5'. Un
polinucleótido que es complementario con respecto a un
polinucleótido de referencia presentará una secuencia que es
25 idéntica al complemento inverso del polinucleótido inverso. Estos

términos y descripciones están bien definidos en la especialidad y son fácilmente entendidos por las personas expertas en la técnica.

Operativamente ligado: un primer polinucleótido está operativamente ligado con un segundo polinucleótido cuando el primer polinucleótido se halla en una relación funcional con el segundo polinucleótido. Cuando se los produce de manera recombinante, los polinucleótidos operativamente ligados son por lo general contiguos, y, cuando sea necesario unir dos regiones codificadoras de proteínas, en el mismo marco de lectura (por ejemplo, en un ORF fusionado por traducción). Sin embargo, no es necesario que los ácidos nucleicos sean contiguos para estar operativamente ligados.

La expresión “operativamente ligado”, cuando se la utiliza con referencia a un elemento genético regulador y con referencia a un polinucleótido de codificación, significa que el elemento regulador afecta la expresión del polinucleótido de codificación ligado. Las expresiones “elementos reguladores” o “elementos de control” se refieren a polinucleótidos que influyen sobre la sincronización y nivel/cantidad de transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o traducción del polinucleótido de codificación asociado. Los elementos reguladores pueden incluir promotores; encabezamientos de traducción; intrones; reforzadores; estructuras de vástago-bucle; polinucleótidos de ligación de represores; polinucleótidos una secuencia de reconocimiento de poliadenilación, etc. Los elementos los particulares pueden estar situados cadena arriba y/o cadena

abajo de un polinucleótido de codificación operativamente ligado al mismo. Asimismo, algunos elementos reguladores particulares operablemente ligados a un polinucleótido de codificación pueden estar situados en la cadena complementaria asociada de la molécula de ácido nucleico doble.

Promotor: Tal como se lo utiliza en la presente, el término “promotor” se refiere a una región de ADN que puede estar situado cadena arriba del inicio de la transcripción, y que puede intervenir en el reconocimiento y ligación de la ARN polimerasa y de otras proteínas para iniciar la transcripción. Un promotor puede estar operativamente ligado a un polinucleótido de codificación para la expresión en una célula, o un promotor puede estar operativamente ligado a un polinucleótido que codifica un péptido señal que puede estar operativamente ligado a un polinucleótido de codificación para la expresión en una célula. Un “promotor de planta” puede ser un promotor capaz de iniciar la transcripción en células de planta. Los ejemplos de promotores bajo control de desarrollo incluyen promotores que preferentemente inicia la transcripción en determinados tejidos, tales como hojas, raíces, semillas, fibras, o vasos, traqueidos, esclerenquima. Tales promotores llevan la denominación de “para tejidos preferidos”. Los promotores que inicia la transcripción solamente en determinados tejidos llevan la denominación de “para tejidos específicos”. Un promotor “específico para determinados tipos de células” primariamente impulsa la expresión en determinados tipos de células en uno o más órganos,

por ejemplo, en las células vasculares de raíces u hojas. Un promotor “inducible” puede ser un promotor que puede estar bajo control ambiental. Los ejemplos de condiciones ambientales que pueden iniciar la transcripción mediante los promotores inducibles incluyen condiciones anaerobias y la presencia de luz. Los promotores específicos para determinados tejidos, de promotores preferidos para determinados tipos de tejidos, de promotores específicos para determinados tipos de células, y de promotores inducibles, constituyen la clase de los promotores “no constitutivos”. Un promotor “constitutivo” es un promotor que puede estar activo bajo la mayoría de las condiciones ambientales en la mayoría de los tipos de células o de tejido.

En algunas modalidades de la invención puede utilizarse cualquier promotor inducible. Ver Ward *et al.* (1993) Plant Mol. Biol. 22:361-366. Con un promotor inducible, la velocidad de la transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero sin limitación: los promotores del sistema ACEI que responden al cobre; el gen *In2* de maíz que responde a los agentes de protección contra los herbicidas bencensulfonamida; el represor Tet de Tn10; y el promotor inducible de un gen de hormona esteroide, cuya actividad transcripcional puede ser inducida por una hormona glucocorticoesteroide (Schena *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:0421).

Los promotores constitutivos ejemplares incluyen, sin limitación: promotores de virus de planta, tales como el promotor 35S

del CaMV (Cauliflower Mosaic Virus, virus mosaico de la coliflor); los promotores de genes de actina del arroz; los promotores de ubiquitina: pEMU; MAS; promotor de H3 histona del maíz; y el promotor ALS, el fragmento *Xba1/NcoI* 5' con respecto al gen estructural de *Brassica napus* ALS3 (o un polinucleótido similar a dicho fragmento *Xba1/NcoI*) (publicación PCT internacional N°. WO96/30530).

Adicionalmente, en algunas modalidades de la invención puede utilizarse cualquier promotor para tejidos específicos o preferido para determinados tejidos. Las plantas transformadas con una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido de codificación operativamente ligado a un promotor para tejidos específicos pueden producir el producto del polinucleótido de codificación exclusivamente, o de manera preferida, en un tejido específico. Los ejemplos de promotores para tejidos específicos o utilizados preferiblemente para determinados tejidos incluyen sin limitación: un promotor preferido para semillas, tal como el gen de faseolina; un promotor específico para hojas e inducido por la luz tal como de *cab* o *rubisco*; un promotor específico para anteras tal como el de *LAT52*; un promotor específico para polen tal como el de *Zm13*; y un promotor preferido para microesporas tal como el de *apg*.

Planta de soja: Tal como se la utiliza en la presente, la expresión “planta de soja” se refiere a una planta de la especie *Glycine* sp.; por ejemplo, *G. max*.

Transformación: Tal como se lo utiliza en la presente, el

término “transformación” o “transducción” se refiere a la transferencia de una o más moléculas de ácido nucleico al interior de una célula. Una célula es “transformada” por una molécula de ácido nucleico transducida en la célula cuando la molécula de ácido nucleico es replicada de manera estable por la célula, sea por captación de la molécula de ácido nucleico en el genoma celular, sea mediante replicación episómica. Tal como se lo utiliza en la presente, el término “transformación” abarca todas las técnicas mediante las que es posible introducir una molécula de ácido nucleico en una célula de este tipo. Los ejemplos incluyen sin limitación: la transfección con vectores virales; la transformación con vectores plásmidos; la electroporación (Fromm *et al.* (1986) *Nature* 319:791-3); la lipofección (Felgner *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7); la microinyección (Mueller *et al.* (1978) *Cell* 15:579-85); la transferencia mediada por *Agrobacterium* (Fraley *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7); la captación directa de ADN; y el bombardeo con micro proyectiles (Klein *et al.* (1987) *Nature* 327:70).

Transgén: Un ácido nucleico exógeno. En algunos ejemplos, un transgén puede ser un ADN que codifica una de las cadenas, o ambas, de un ARN capaz de formar una molécula de dsARN que comprende un polinucleótido que es complementario con respecto a una molécula de ácido nucleico hallada en una plaga de coleópteros. En otros ejemplos, un transgén puede ser un gen (por ejemplo, un gen de resistencia a los herbicidas, un gen de tolerancia a los

herbicidas, un gen que codifica un compuesto industrial o farmacéuticamente útil, o un gen que codifica un rasgo agrícola deseado). En estos ejemplos, y en otros, un transgén puede contener elementos reguladores operativamente ligados a un polinucleótido de codificación del transgén (por ejemplo, un promotor).

Vector: Una molécula de ácido nucleico tal como es introducida en una célula, por ejemplo, para producir una célula transformada. Un vector puede incluir elementos genéticos que le permiten replicarse en la célula hospedadora, tales como un origen de replicación. Los ejemplos de vectores incluyen, sin limitación: Un plásmido; un cósmido; un bacteriófago o un virus que transporta ADN al interior de una célula. Un vector también puede contener uno o más genes, lo que incluye genes que producen moléculas antisentido y/o genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, con lo cual hace que la célula exprese las moléculas de ácido nucleico y/o las proteínas codificadas por el vector. Opcionalmente un vector contiene materiales para ayudar al ingreso de la molécula de ácido nucleico en la célula (por ejemplo, un liposoma, recubrimiento proteico, etc.).

Rendimiento: Un rendimiento estabilizado de aproximadamente el 100% o mayor referido rendimiento de variedades de verificación en el mismo lugar de cultivo que crecen simultáneamente y en las mismas condiciones. En modalidades particulares, la expresión “rendimiento mejorado” o “mejora del rendimiento” se refiere a un

cultivar que tiene un rendimiento estabilizado del 105% o mayor referido al rendimiento de variedades de verificación el mismo lugar de cultivo que tiene densidades significativas de plagas de coleópteros que son nocivas con respecto a dicha planta del cultivo cultivada simultáneamente y en las mismas condiciones, las cuales son combatidas mediante las composiciones y métodos descritos en la presentes.

A menos que específicamente se indique o implique otra cosa, los términos “un”, “uno”, “una”, y “el”, “la”, significan “por lo menos uno/a” tal como se utiliza en la presente.

A menos que específicamente se explique de otra manera, la totalidad de los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo sentido que el comúnmente entendido por las personas con la pericia habitual en la especialidad de la cual esta divulgación forma parte. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en por ejemplo: Lewin's Genes X, Jones & Bartlett Publishers, 2009 (ISBN 10 0763766321); Krebs *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Meyers R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Todos los porcentajes se expresan en peso, y todas las proporciones de mezclas de solventes se dan en volumen, a menos que se indique otra cosa. Todas las temperaturas se expresan en grados centígrados.

IV. Moléculas de ácido nucleico que comprenden polinucleótido de plagas de coleópteros

A. Generalidades

En la presente se describen moléculas de ácido nucleico útiles
5 para el control de plagas de coleópteros. Las moléculas de ácido
nucleico descritas incluyen polinucleótidos diana (por ejemplo, genes
nativos, y polinucleótidos no codificantes), dsARN, siARN, shARN,
hpARN, y miARN. Por ejemplo, en algunas modalidades se describen
moléculas de siARN, miARN, shARN y/o hpARN que puede ser
10 específicamente complementarios con respecto a la totalidad o una
parte de los ácidos nucleicos nativos en una plaga de coleópteros.
En estas modalidades y en otras, el o los ácidos nucleicos nativos
pueden ser uno o más genes diana, cuyo producto puede, por
ejemplo y sin limitación: intervenir en un proceso reproductivo o
15 intervenir en un desarrollo larvario. Las moléculas de ácido nucleico
descritas en la presente, cuando son introducidas en una célula (por
ejemplo, por medio de una transmisión parental) que comprende por
lo menos uno o más ácido nucleicos nativos, con respecto a las
cuales las moléculas de ácido nucleico son específicamente
20 complementarias, pueden iniciar ARNI en la célula, y
consiguientemente reducir o eliminar la expresión de o de los ácidos
nucleicos nativos. En algunos ejemplos, la reducción o eliminación
de la expresión del gen diana por una molécula de ácido nucleico
que es específicamente complementario con respecto a la misma,
25 puede resultar en la reducción o cesación de la reproducción en la

plaga de coleópteros y/o en el crecimiento, desarrollo y/o alimentación en la progenie de la plaga. Estos métodos pueden reducir de manera significativa la amplitud de una subsiguiente generación de la plaga en una infestación, por ejemplo, sin que por
 5 ello resulte indirectamente una mortalidad en la o en las plagas que entran en contacto con la molécula de iARN.

En algunas modalidades, es posible seleccionar por lo menos un gen diana en una plaga de coleópteros, en donde el gen diana comprende un polinucleótido *hunchback*. En ejemplos particulares,
 10 se selecciona un gen diana en una plaga de coleópteros, en donde el gen diana comprende un polinucleótido seleccionado entre las SEC ID NOs; 1, 3 y 67.

El *hunchback* del gusano occidental de las raíces del maíz representa una secuencia de 1955 bp y 573 aminoácidos (proteína
 15 HUNCHBACK). Dentro de esta secuencia, se predican seis dominios de dedos de zinc de tipo C2H2 en las posiciones 226-248, 255-277, 283-305, 311-335, 520-542, y 548-572 de acuerdo con su rol como un factor de transcripción de dedos de zinc. Ver, por ejemplo, Tautz *et al.* (1987) Nature 327:383-9. Cuando se investiga en la base de
 20 datos de NCBI mediante el algoritmo BLAST. La secuencia más similar era de *Tribolium castaneum*, y presentaba una identidad de secuencias de tan sólo el 53%.

En algunas modalidades, un gen diana puede ser una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que puede ser
 25 traducida inversamente in silico a un polipéptido que comprende una

secuencia de aminoácidos contigua que tiene una identidad de
 secuencias de por lo menos aproximadamente el 85% (por ejemplo,
 una identidad de por lo menos 84%, 85%, de aproximadamente 90%,
 de aproximadamente 95%, de aproximadamente 96%, de
 5 de aproximadamente 97%, de aproximadamente 98%, de
 aproximadamente 99%, de aproximadamente 100%, o de 100%) con
 respecto a la secuencia de aminoácidos de un producto proteína de
 un polinucleótido de *hunchback*. Un gen diana puede ser cualquier
 ácido nucleico en un insecto plaga, cuya inhibición
 10 postranscripcional tiene un efecto nocivo sobre el crecimiento y/o
 supervivencia de la plaga, por ejemplo, de manera de proveer a una
 planta un beneficio protector contra la plaga. En ejemplos
 particulares, un gen diana es una molécula de ácido nucleico que
 comprende un polinucleótido que puede ser traducido inversamente
 15 in silico como un polipéptido que comprende una secuencia de
 aminoácidos continua que tiene una identidad de por lo menos
 aproximadamente el 85%, de aproximadamente el 90%, de
 aproximadamente el 95%, de aproximadamente el 96%, de
 aproximadamente el 97%, de aproximadamente el 98%, de
 20 aproximadamente el 99%, de aproximadamente el 100%, o del 100%,
 con respecto a la secuencia de aminoácidos que es el producto de
 traducción in silico de la SEC ID NO:2.

En algunas modalidades se proveen ADN, cuya expresión tiene
 como resultado una molécula de ARN que comprende un
 25 polinucleótido que es específicamente complementario con respecto

a la totalidad o parte de una molécula de ARN nativa que es codificada por un polinucleótido de codificación en una plaga de coleópteros. En algunas modalidades, después de la ingesta de la molécula de ARN expresada por una plaga de coleópteros, puede
 5 obtenerse una regulación descendente del polinucleótido de codificación en las células de la plaga, o en las células de la progenie de la plaga. En modalidades particulares, la regulación descendente del polipéptido de codificación en las células de la plaga de coleópteros puede resultar en una reducción o cesación de
 10 la reproducción y/o proliferación en la plaga y/o del crecimiento, desarrollo y/o alimentación en la progenie de la plaga.

En algunas modalidades, los polinucleótidos diana incluyen ARN no codificantes transcritos, tales como 5'UTR; 3'UTR; encabezamientos desdoblados; intrones; outrones (por ejemplo,
 15 5'UTR ARN subsiguientemente modificado en escisión trans); donatriones (por ejemplo, ARN no codificante requerido para proveer secuencia donantes para el escisión trans); y otros ARN no codificantes transcritos de genes de plaga de coleópteros diana. Tales polinucleótidos pueden derivarse de genes tanto
 20 monocistrónicos como policistrónicos.

Por lo tanto, en relación con algunas modalidades se describen moléculas de iARN (por ejemplo, dsARN, siARN, miARN, shARN, y hpARN) que comprenden por lo menos un polinucleótido que es específicamente complementario con respecto a la totalidad o parte
 25 de un ácido nucleico en una plaga de coleópteros. En algunas

modalidades una molécula de iARN puede comprender uno o más polinucleótidos que son complementarios con respecto a la totalidad o una parte de una pluralidad de ácido nucleicos diana; por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más ácidos nucleicos diana. En

5 modalidades particulares, es posible producir una molécula de iARN *in vitro*, o *in vivo* mediante un organismo genéticamente modificado, tal como una planta o bacteria. También se revelan cADN que pueden ser utilizados para la producción de moléculas de dsARN, moléculas de siARN, moléculas de miARN, moléculas de shARN y/o

10 moléculas de hpARN que son específicamente complementarias con respecto a la totalidad o parte de un ácido nucleico diana en una plaga de coleópteros. También se describen constructos de ADN recombinantes destinados a ser utilizados en lograr una transformación estable de anfitriones diana particulares. Los

15 anfitriones diana pueden expresar niveles efectivos de moléculas de dsARN, siARN, miARN, shARN y/o hpARN de los constructos de ADN recombinantes. Por lo tanto, también se describe un vector de transformación de plantas que comprende por lo menos un polinucleótido operablemente ligado a un promotor heterólogo

20 funcional en una célula de planta, en donde la expresión del o de los polinucleótidos tiene como resultado una molécula de ARN que comprende una tira de nucleobases contiguas que es específicamente complementario con respecto a la totalidad o parte de un ácido nucleico diana en una plaga de coleópteros.

25 En ejemplos particulares, las moléculas de ácido nucleico

útiles para el control de las plagas de coleópteros pueden incluir: la totalidad o parte de un ácido nucleico nativo aislado a partir de *Diabrotica* que comprende un polinucleótido *hunchback* (por ejemplo, cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3, y 67); ADN que al ser expresados resultan en una molécula de ARN que comprende un polinucleótido que es específicamente complementario con respecto a la totalidad o parte de una molécula de ARN nativa que es codificado por *hunchback*; moléculas de ARi (por ejemplo, dsARN, siARN, miARN, shARN, y hpARN) que comprende por lo menos un polinucleótido que es específicamente complementario con respecto a la totalidad o parte de una molécula de ARN codificado por *hunchback*; cADN que pueden utilizarse para la producción de moléculas de dsARN, moléculas de siARN, moléculas de miARN que son específicamente complementarias con respecto a la totalidad o parte de una molécula de ARN codificada por *hunchback*; y constructos de ADN recombinantes destinados a ser utilizados en lograr una transformación estable de anfitriones diana particulares, en donde una célula hospedadora comprende una o más de las moléculas de ácido nucleico precedentes.

B. Moléculas de ácido nucleico

La presente invención provee, *inter alia*, moléculas de iARN (por ejemplo, de dsARN, de siARN, de miARN, de shARN, y de hpARN) que inhiben la expresión de los genes diana en una célula, tejido u órgano de una plaga de coleópteros; y moléculas de ADN capaces de ser expresadas en una molécula de iARN en una célula o

microorganismo para inhibir la expresión del gen diana en una célula, tejido, u órgano de una plaga de coleópteros.

Algunas modalidades de la invención de una molécula de ácido nucleico aislada que comprende por lo menos un polinucleótido ((por
 5 ejemplo, uno, dos, tres o más polinucleótidos) seleccionados entre un grupo que consiste en: la SEC ID NO:1; el complemento de la SEC ID NO:1; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos (por ejemplo, por lo menos 19 nucleótidos contiguos) de la SEC ID NO:1 (por ejemplo, la SEC ID NO:3 y la SEC ID NO:67); el
 10 fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC ID NO:1; un polinucleótido de codificación nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende la SEC ID NO:1; el complemento de un polinucleótido codificador nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:1; un fragmento
 15 de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido de codificación nativo de Un organismo *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:1; y el fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido de codificación nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:1. En
 20 modalidades particulares, el contacto con, o la ingesta del polinucleótido aislado por una plaga de coleópteros inhibe el crecimiento, desarrollo, reproducción y/o alimentación de la plaga.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender por lo menos un polinucleótido (por
 25 ejemplo, uno, dos, tres o más polinucleótidos) seleccionados de

entre el grupo que consiste en: la SEC ID NO:70; el complemento de la SEC ID NO:70; la SEC ID NO:71; el complemento de la SEC ID NO:71; la SEC ID NO:72; el complemento de la SEC ID NO:72; la SEC ID NO:73; el complemento de la SEC ID NO:73; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC ID NOs:70, 71, y 73; el fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC ID NOs:70, 71, y 73; un polirribonucleótido transcrito en un organismo *Diabrotica* a partir de un gen que comprende la SEC ID NO:1; el complemento de un polirribonucleótido transcrito en un organismo *Diabrotica* a partir de un gen que comprende la SEC ID NO:1; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polirribonucleótido transcrito en un organismo *Diabrotica* a partir de un gen que comprende la SEC ID NO:1; y el fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polirribonucleótido transcrito e un organismo *Diabrotica* a partir de un gen que comprende la SEC ID NO:1 En modalidades particulares, el contacto con, o la ingesta del polinucleótido aislado por una plaga de coleópteros inhibe el crecimiento, desarrollo, reproducción y/o alimentación de la plaga.

En otras modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender por lo menos un ADN (por ejemplo, uno, dos, tres o más ADN) capaces de ser expresados como una molécula de iARN en una célula o microorganismo para inhibir la expresión de los genes diana en una célula, tejido u órgano de una plaga de coleópteros. Tales uno o más ADN pueden estar operativamente

ligados a un promotor que funciona en una célula que comprende la molécula de ADN para iniciar o reforzar la transcripción del ARN codificado capaz de formar una o más moléculas de dsARN. En una modalidad, la por lo menos un ADN (por ejemplo, uno, dos, tres o más ADN) puede derivarse del polinucleótido de la SEC ID NO:1. Los derivados de la SEC ID NO:1 incluyen fragmentos de la SEC ID NO:1. En algunas modalidades, un fragmento de este tipo puede comprender, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la SEC ID NO:1, o uno de sus complementos. Por lo tanto, un fragmento de este tipo puede comprender, por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o más nucleótidos contiguos de la SEC ID NO:1, o uno de sus complementos. En algunos ejemplos, un fragmento de este tipo puede comprender, por ejemplo, por lo menos 19 nucleótidos contiguos (por ejemplo, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos contiguos) de la SEC ID NO:1, o uno de sus complementos.

Algunas modalidades comprenden la introducción de moléculas de dsARN parcial o totalmente estabilizadas en una plaga de coleópteros a efectos de inhibir la expresión de un gen diana en una célula, tejido u órgano de la plaga de coleópteros. Cuando se expresan en una molécula de iARN (por ejemplo, dsARN, siARN, miARN, shARN, y hpARN) y son ingeridos por una plaga de coleópteros, los polinucleótidos que comprenden uno o más

fragmentos de cualquiera de las SEC ID NOs 1, 3 y 67, y de sus complementos, pueden causar uno o más de los siguientes: muerte, detención del desarrollo, inhibición del crecimiento, cambio en la relación entre los sexos, reducción de la magnitud de la cría, cese de la infestación y/o cese de la alimentación, de la plaga de coleópteros. En ejemplos particulares, los polinucleótidos que comprenden uno o más fragmentos (por ejemplo, polinucleótidos inclusive de aproximadamente 15 a aproximadamente 300 nucleótidos) de cualquiera de las secuencias SEC ID NOs:1, 3 o 67, y sus complementos, causan una reducción en la capacidad de una generación existente de la plaga para producir una generación subsiguiente de la plaga.

En determinadas modalidades, las moléculas de dsARN provistas por la invención comprenden polinucleótidos que son complementarios con respecto a un transcrito de un gen diana que comprende las SEC ID NOs:1, 3, 46 y/o 47 y/o polinucleótidos que son complementarios con respecto a un fragmento de las SEC ID NOs:1, 3, 46 y/o 67, la inhibición de cuyo gen diana en una plaga de coleópteros tiene como resultado la reducción o remoción de un agente polipéptido o polinucleótido que es esencial para el crecimiento, desarrollo, o de alguna otra función biológica, de la plaga o de su progenie. Un polinucleótido seleccionado puede presentar una identidad de secuencias de aproximadamente 80% a aproximadamente 100% con respecto a las SEC ID NOs:1, 3, 46 y/o 47, un fragmento contiguo de las SEC ID NOs:1, 3, 46 y/o 47, o el

complemento de cualquiera de los precedentes. Por ejemplo, un polinucleótido seleccionado puede presentar una identidad de secuencias del 79%; 80%; aproximadamente 81%; aproximadamente 82%; aproximadamente 83%; aproximadamente 84%;
 5 aproximadamente 85%; aproximadamente 86%; aproximadamente 87%; aproximadamente 88%; aproximadamente 89%; aproximadamente 90%; aproximadamente 91%; aproximadamente 92%; aproximadamente 93%; aproximadamente 94% aproximadamente 95%; aproximadamente 96%; aproximadamente
 10 97%; aproximadamente 98%; aproximadamente 98,5%; aproximadamente 99%; aproximadamente 99,5%; o de aproximadamente 100% con respecto a las SEC ID NOs:1, 3, 46 y/o 47, o el complemento de cualquiera de los precedentes.

En algunas modalidades, una molécula de ADN capaz de ser
 15 expresada como una molécula de iARN en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen diana puede comprender un único polinucleótido que es específicamente complementario con respecto a la totalidad o parte de un polinucleótido nativo hallado en una o más especies de plagas de
 20 coleópteros, o la molécula de ADN puede ser construida como una quimera a partir de una pluralidad de tales polinucleótidos específicamente complementarios.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico puede comprender un primer y un segundo polinucleótidos separados
 25 por un "ligador". Un ligador puede ser una región que comprende

cualquier secuencia de nucleótidos que facilite la formación de estructuras secundarias entre los polinucleótidos primero y segundo, donde se desee esto. En una modalidad, el ligador es parte de un polinucleótido de sentido o de antisentido de codificación para mARN. Como alternativa el ligador puede comprender cualquier combinación de nucleótidos o de homólogos de estos que sean capaces de ser ligados covalentemente a una molécula de ácido nucleico. En algunos ejemplos, el ligador puede comprender un intrón (por ejemplo, como intrón ST-LS1).

Por ejemplo, en algunas modalidades, la molécula de ADN puede comprender un polinucleótido que codifique una o más moléculas de ARN diferentes, en donde cada uno de las diferentes moléculas de ARN comprende un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, en donde los polinucleótidos primero y segundo son complementarios entre sí. Los polinucleótidos primero y segundo pueden estar conectados dentro de una molécula de ARN por un ligador. El ligador puede ser parte del primer polinucleótido o del segundo polinucleótido. La expresión de una molécula de ARN que comprende los polinucleótidos primero y segundo puede conducir a la formación de una molécula de dsARN, mediante un apareamiento específico entre las moléculas de base de los nucleótidos de los polinucleótidos primero y segundo. El primer polinucleótido o el segundo polinucleótido pueden ser sustancialmente idénticos a un polinucleótido (por ejemplo, un gen diana, o polinucleótido no de codificación transcrito), nativo con respecto a una plaga de

coleópteros, uno de sus derivados, o un polinucleótido complementario con respecto al mismo.

Las moléculas de sARN y de ácido nucleico comprenden dobles cadenas de ribonucleótidos polimerizados, y pueden incluir modificaciones sea en la estructura principal de fosfato–azúcar sea en el nucleósido. Las modificaciones en la estructura del ARN pueden ser ajustadas a medida a efectos de permitir una inhibición específica. En una modalidad, las moléculas de ARN pueden ser modificadas mediante un proceso enzimático ubicuo de manera tal que es posible generar moléculas de siARN. Este proceso enzimático puede utilizar una enzima RNasa III, tal como DICER en eucariotas, *in vitro* o *in vivo*. Ver Elbashir *et al.* (2001) Nature 411:494-8; y Hamilton y Baulcombe (1999) Science 286(5441):950-2. El DICER o las enzimas RNase4 III funcionalmente equivalentes desdoblan cadenas de dsARN más largas y/o moléculas de hpARN en oligonucleótidos más pequeños (por ejemplo, siARN), cada uno de los cuales tiene una longitud de aproximadamente 19-25 nucleótidos. Las moléculas de siARN producidas por estas enzimas tienen sobrevuelos 3' de 2 a 4 nucleótidos, y terminales 5' fosfato y 3' hidroxilo. Las moléculas de siARN generadas por las enzimas RNasa III I son desarrolladas y separadas en ARN de una sola cadena en la célula. Las moléculas de siARN seguidamente se hibridan específicamente con ARNs transcritos desde un gen diana, y ambas moléculas de ARN son subsiguientemente degradadas por un mecanismo inherente que degrada el ARN intracelular. Este proceso

puede tener como resultado la degradación efectiva o remoción del ARN codificado por el gen diana en el organismo diana. El resultado es el silenciamiento postranscripcional del gen etiquetado. En algunas modalidades, las moléculas de siARN producidas por las

5 enzimas Rnase III endógenas de moléculas heterólogas de ácido nucleico pueden regular la regulación descendente de genes diana en plaga de coleópteros.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico puede incluir por lo menos un polinucleótido de presentación no

10 natural que puede ser transcrito en una molécula de ARN de una sola molécula capaz de formar una molécula de dsARN *in vivo* mediante hibridación intermolecular. Típicamente, tales dsARN se autoensamblan, y pueden ser provistos en la fuente de nutrición de una plaga de coleópteros., de manera de lograr una inhibición

15 postranscripcional de un gen diana. En estas modalidades y en otras, una molécula de ácido nucleico puede comprender dos polinucleótidos diferentes de presentación no natural, cada uno de los cuales es específicamente complementario con respecto a un gen diana diferente en una plaga de coleópteros. Cuando se provee una

20 molécula de ácido nucleico de este tipo con una molécula de dsARN a una plaga de coleópteros, la molécula de dsARN inhibe la expresión de por lo menos dos genes diana diferentes en la plaga.

C. Obtención de moléculas de ácido nucleico

Puede utilizarse una variedad de polinucleótidos en plaga de

25 coleópteros como dianas para el diseño de moléculas de ácido

nucleico, tales como moléculas de iARN y de ADN que codifican iARN. Sin embargo, la selección de polinucleótidos nativos no es un proceso directo. Solamente un pequeño número de polinucleótidos nativos en una plaga de coleópteros serán dianas efectivas. No
5 puede predecirse con certeza si un polinucleótido nativo particular puede ser regulado ascendentemente de manera efectiva por las moléculas de ácido nucleico de la invención, o si la regulación descendente de un polinucleótido nativo particular tendrá un efecto nocivo sobre el crecimiento, viabilidad, proliferación y/o reproducción
10 de la plaga de coleópteros. La gran mayoría de los polinucleótidos nativos de plagas de coleópteros, tales como los EST aislados a partir de ellos, (por ejemplo, los polinucleótidos de plaga de coleópteros enumerados en la patente de Estados Unidos N°. 7,612,194), no tienen un efecto nocivo sobre el crecimiento,
15 viabilidad, proliferación y/o reproducción de la plaga. Tampoco puede predecirse cuál de los polinucleótidos nativos que puede tener un efecto nocivo sobre una plaga de coleópteros tiene la capacidad de ser utilizado en técnicas recombinantes para expresar moléculas de ácido nucleico que sean complementarias con respecto a dichos
20 polinucleótidos nativos en una planta anfitrión y para prever el efecto nocivo sobre la plaga que se alimentan, sin ocasionar ningún daño a la planta anfitrión.

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, las moléculas de dsARN a ser provistas en la planta
25 anfitrión de una plaga de coleópteros, son seleccionadas para

apuntar a cADN que codifican o partes de proteínas esenciales para la reproducción y/o desarrollo de la plaga, tales como los polipéptidos que intervienen en las vías bioquímicas, metabólicas o catabólicas, división celular, reproducción, metabolismo energético, desarrollo embrionario, desarrollo larvario, regulación transcripcional, y similares. Como se describe en la presente, la ingesta por un organismo diana de las composiciones que contiene uno o más dsARN, de los que por lo menos un segmento es específicamente complementario con respecto a por lo menos un segmento sustancialmente idéntico del ARN producido en las células del organismo plaga diana, puede resultar en el fracaso o reducción de la capacidad de aparearse, depositar huevos, o producir una progenie viable. Puede utilizarse un polinucleótido, sea de ADN sea de ARN, derivado de una plaga de coleópteros, para construir células de planta que sean resistentes a la infestación por las plagas. La planta anfitrión de la plaga de coleópteros (por ejemplo, *Z. mays*), por ejemplo, puede ser transformada de manera en contener uno o más polinucleótidos derivados de la plaga de coleópteros, como se provee en la presente. El polinucleótido transformado en el anfitrión puede codificar uno o más ARNs que forman una estructura de dsARN en las células o fluidos biológicos dentro del anfitrión transformado, y por lo tanto hacen que el dsARN sea disponible si/cuando la plaga forma una relación nutricional con el anfitrión transgénico. Esto puede tener como resultado la supresión de la expresión de uno o más genes en las células de la plaga, y en última

instancia la inhibición de su crecimiento y/o desarrollo.

En modalidades alternativas, se apunta a un gen que interviene esencialmente en el crecimiento, desarrollo y reproducción de una plaga de coleópteros. Otros genes diana genes destinados a ser
5 utilizados en la presente invención pueden incluir, por ejemplo, aquellos que desempeñan roles importantes en el viabilidad de la plaga de coleópteros, su movimiento, migración, crecimiento, desarrollo, infestividad, y establecimiento de los sitios de alimentación. Por lo tanto, un gen diana puede ser un gen de tipo
10 constitutivo o un factor de transcripción. Además, un polinucleótido de plaga de coleópteros nativo destinado a ser utilizado en la presente invención, también puede haber sido derivado de un homólogo (por ejemplo, un ortólogo), de una planta, gen viral, bacteriano o de insecto, cuya función es conocida de las personas
15 expertas, y cuyo polinucleótido es específicamente hibridable con un gen diana en el genoma de la plaga de coleópteros diana. Los métodos para identificar un homólogo de un gen con una secuencia de nucleótidos conocida por hibridación, son conocidos de los expertos.

20 En algunas modalidades, la invención provee métodos para obtener una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido para producir una molécula de iARN (por ejemplo, dsARN, siARN, miARN, shARN, y hpARN). Una de tales modalidades comprende: (a) analizar uno o más genes diana para establecer su
25 expresión, función y fenotipo sobre la supresión, mediada por

dsARN, en una plaga de coleópteros; (b) sondear una biblioteca de cADN o de gADN con una sonda que comprende la totalidad o una porción de un polinucleótido o de uno de sus homólogos de una plaga de coleópteros etiquetado y que presenta un fenotipo de reproducción o de desarrollo alterado (por ejemplo, reducido) en un análisis de supresión mediado por dsARN; (c) identificar un clon de ADN que de manera específica hibrida con la sonda; (d) aislar el clon de ADN identificado en la etapa (b); (e) secuenciar el fragmento de cADN o de gADN que comprende el clon aislado en la etapa (d), en donde la molécula de ácido nucleico secuenciada comprende la totalidad o una porción sustancial del ARN o de uno de sus homólogos; y (f) sintetizar químicamente la totalidad o una porción sustancial de un gen, o un siARN, miARN, hpARN, mARN, shARN, o dsARN.

En otras modalidades, un método para obtener un fragmento de ácido nucleico que comprende un polinucleótido para producir una porción sustancial de una molécula de iARN (por ejemplo, dsARN, siARN, miARN, shARN, y hpARN) incluye: (a) sintetizar cebadores polinucleótidos primero y segundo específicamente complementarios con respecto a una porción de un polinucleótidos nativo de una plaga de coleópteros etiquetado; y (b) ampliar un inserto de cADN o de gADN presentes en un vector de clonación utilizando los cebadores oligonucleótidos primero y segundo de la etapa (a), en donde la molécula de ácido nucleico ampliado comprende una porción sustancial de una molécula de siARN, miARN, hpARN, mARN,

shARN, o dsARN.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden aislarse, ampliarse o producirse mediante una cantidad de procesos. Por ejemplo, es posible obtener una molécula de iARN (por ejemplo, de dsARN, siARN, miARN, shARN, y hpARN) mediante amplificación por PCR de un polinucleótido diana (por ejemplo, un gen diana o un polinucleótido no de codificación transcrito diana) derivado de una biblioteca de gADN o de cADN, o porciones de éstos. El ADN o ARN pueden ser extraídos de un organismo diana, y las bibliotecas de ácidos nucleicos pueden prepararse a partir de ello utilizando métodos conocidos de las personas expertas. Las bibliotecas de gADN o de cADN generadas a partir de un organismo diana pueden ser utilizados para la amplificación por PCR y para el secuenciación de genes diana. Puede utilizarse un producto de PCR confirmado como una plantilla para la transcripción *in vitro* a efectos de generar ARN de sentido y de antisentido con promotores mínimos. Como alternativa, es posible sintetizar moléculas de ácidos nucleicos mediante cualquiera de un número de técnicas (ver, por ejemplo, Ozaki *et al.* (1992) Nucleic Acids Research, 20: 5205-5214; y Agrawal *et al.* (1990) Nucleic Acids Research, 18: 5419-5423), lo que incluye el uso de un sintetizador de ADN automatizado (por ejemplo, un P.E. Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.) modelo 392 o un sintetizador 394 ADN/ARN), utilizándose químicas estándar, tales como la química de las fosforamiditas. Ver, por ejemplo, Beaucage *et al.* (1992) Tetrahedron, 48: 2223-2311; y las patentes de Estados

Unidos Nos. 4,980,460, 4,725,677, 4,415,732, 4,458,066 y 4,973,679. También pueden utilizarse métodos químicos alternativas que resultan en grupos de estructura principal no naturales, tales como fosforotioato, fosforamidato, y similares.

5 Una molécula de ARN, dsARN, siARN, miARN, shARN, o hpARN de la presente invención puede producirse mediante métodos químicos o enzimáticos por una persona con pericia mediante reacciones manuales o automatizadas, o *in vivo* en una célula que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende un
10 polinucleótido que codifica la molécula de ARN, dsARN, siARN, miARN, shARN, o hpARN. También es posible producir ARN mediante síntesis orgánica parcial o total – cualquier ribonucleótido modificado puede ser introducido mediante síntesis enzimática u orgánica *in vitro*. Es posible sintetizar una molécula de ARN
15 mediante una ARN polimerasa celular o mediante una ARN polimerasa bacteriófaga (por ejemplo, T3 ARN polimerasa, T7 ARN polimerasa, y SP6 ARN polimerasa). En la técnica se conocen constructos de expresión útiles para la clonación y expresión de oligonucleótidos, Ver, por ejemplo, la publicación PCT internacional
20 Nº. WO97/32016; y las patentes de Estados Unidos Nos. 5,593,874, 5,698,425, 5,712,135, 5,789,214 y 5,804,693. Las moléculas de ARN que son sintetizadas químicamente o mediante síntesis enzimática pueden ser purificadas antes de su introducción en una célula. Por ejemplo, las moléculas de ARN pueden ser purificadas a partir de
25 una mezcla mediante extracción con un solvente o resina,

precipitación, electroforesis, cromatografía, o una de sus combinaciones. Como alternativa, las moléculas de ARN que son sintetizadas químicamente o mediante síntesis enzimática *in vitro* pueden utilizarse con ninguna purificación o con un mínimo de purificación, a efectos de evitar pérdidas debidas al procesamiento de las muestras. Las moléculas de ARN pueden ser secadas para su almacenamiento o ser disueltas en un medio acuoso. La solución puede contener tampones o sales para promover el revenido y/o la estabilización de las cadenas dúplex de la molécula de dsARN.

En modalidades, es posible formar una molécula de dsARN mediante una cadena de ARN simple autocomplementaria o mediante dos cadenas de ARN complementarias. Las moléculas de dsARN pueden ser sintetizadas sea en *in vivo* sea *in vitro*. Una ARN polimerasa de la célula mediará la transcripción de uno o dos de las cadenas de ARN *in vivo*, o la ARN polimerasa clonada puede ser útil para mediar la transcripción *in vivo* o *in vitro*. La inhibición postranscripcional de un gen diana en un insecto plaga puede estar etiquetada a anfitrión mediante transcripción específica en un órgano, tejido, o tipo de célula del anfitrión (por ejemplo, mediante el uso de un promotor para tejidos específicos); la estimulación de una condición ambiental en el anfitrión (por ejemplo, mediante el uso de un promotor imposible que responda a infección, estrés, temperatura y/o inductores químicos); y/o transcripción diseñada en una etapa o edad de desarrollo del anfitrión (por ejemplo, mediante el uso de un promotor del desarrollo para etapas específicas). Las cadenas de

ARN que forman una molécula de dsARN, tanto si se transcribe *in vitro* como *in vivo*, pueden estar poliadenilados o no, y pueden ser capaces o no, de ser traducidas en un polipéptido mediante un aparato traductor de células.

5 **D. Vectores recombinantes y transformación de células anfitrión**

En algunas modalidades, la invención también provee una molécula de ADN para su introducción en una célula (por ejemplo, una célula bacteriana, una célula de levadura, o una célula de
10 planta), en donde la molécula de ADN comprende un polinucleótido que, al tener lugar la expresión del ARN y la ingesta por una plaga de coleópteros, tiene como efecto la supresión de un gen diana en una célula, tejido, u órgano de la plaga. Por lo tanto, algunas modalidades proveen una molécula recombinante de ácido nucleico
15 que comprende un polinucleótido capaz de ser expresado como una molécula de iARN (por ejemplo, de dsARN, siARN, miARN, shARN, y hpARN) en una célula de planta para inhibir la expresión del gen diana en una plaga de coleópteros. A efectos de iniciar o reforzar la expresión, tales moléculas recombinantes moléculas de ácido
20 nucleico pueden comprender uno más elementos reguladores, los cuales elementos reguladores pueden estar operativamente ligados al polinucleótido capaz de ser expresado como un iARN. Se conocen métodos para expresar una molécula de supresión de genes en las plantas, y se los puede utilizar para expresar un oligonucleótido de
25 la presente invención. Ver, por ejemplo, la publicación PCT

internacional N°. WO06/073727; y la publicación de patente de Estados Unidos N°. 2006/0200878 A1).

En modalidades específicas, una molécula de ADN recombinante de la invención puede comprender un polinucleótido que codifica un ARN que puede formar una molécula de dsARN. Tales moléculas de ADN recombinantes pueden codificar ARNs que pueden formar moléculas de dsADN capaces de inhibir la expresión de uno o más genes diana endógenos en una célula de plaga de coleópteros al tener lugar la ingesta. En muchas modalidades, un ARN transcrito puede formar una molécula de dsARN que puede ser provista en una forma estabilizada; por ejemplo, como una de horquilla y como una estructura de tallo y bucle.

En algunas modalidades, es posible formar una cadena de una molécula de dsARN mediante transcripción a partir de un polinucleótido que es sustancialmente homólogo con respecto al ARN codificado por un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID NOs:1, 3, 46, y 67; el complemento de las SEC ID NOs:1, 3, 46 y/o 67; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de las SEC ID NOs:1, 3, 46 y/o 67; el fragmento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de las SEC ID NOs:1, 3, 46 y/o 67; un polinucleótido de codificación nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende las SEC ID NOs:1, 3 y/o 67; el complemento de un polinucleótido codificador nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende las SEC ID NOs:1, 3 y/o 67; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de

un polinucleótido de codificación nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende las SEC ID NO:1, 3 y/o 67; y el fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido de codificación nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende las SEC ID NOs:1, 3 y/o 67.

En modalidades particulares, una molécula de ADN recombinante que codifica un ARN que puede formar una molécula de dsARN puede comprender una región codificadora en donde por lo menos dos polinucleótidos están dispuestos de manera tal que uno de los polinucleótidos se halla en una orientación sentido, y el otro polinucleótido se halla en una orientación antisentido, referido a por lo menos un promotor, en donde el polinucleótido de sentido y el polinucleótido de antisentido están ligados o conectados mediante un ligador, consistente en por ejemplo aproximadamente cinco (~5) a aproximadamente mil (~1,000) nucleótidos. El ligador puede formar un bucle entre los polinucleótidos de sentido y de antisentido. El polinucleótido de sentido y el polinucleótidos de antisentido pueden ser sustancialmente homólogos con respecto a un gen diana (por ejemplo, un gene *hunchback* que comprende la SEC ID NO:1) o uno de sus fragmentos. En algunas modalidades, sin embargo, una molécula de ADN recombinante puede codificar un ARN que puede formar una molécula de dsARN sin un ligador. En modalidades, un polinucleótido de codificación de sentido y un polinucleótido de codificación de antisentido pueden tener diferentes longitudes.

Los polinucleótidos identificados por tener un efecto nocivo

sobre una plaga de coleópteros o un efecto protector con respecto a las plagas de coleópteros, pueden ser fácilmente incorporados en moléculas de dsARN expresados mediante la creación de casetes de expresión adecuados en una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención. Por ejemplo, tales polinucleótidos puede ser expresados como una de horquilla con un estructura de tallo y bucle para lo cual se toma un primer segmento correspondiente a un polinucleótido de gen diana (por ejemplo, un gen *hunchback* que comprende la SEC ID NO:1), y sus fragmentos; se liga este polinucleótido a una región ligador del primer segmento que no es homóloga ni complementaria con respecto al primer segmento; y se liga esto a un tercer segmento, en donde por lo menos una porción del tercer segmento es sustancialmente complementario con respecto al primer segmento. Un constructo de este tipo forma una estructura de tallo y bucle mediante el apareamiento intramolecular de pares de bases con el tercer segmento, en donde se forma la estructura de bucle que comprende el segundo segmento. Ver, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos Nos. 2002/0048814 y 2003/0018993; y las publicaciones internacionales PCT Nos. WO94/01550 y WO98/05770. Es posible generar una molécula de dsARN por ejemplo, en la forma de estructuras doble tales como una estructura de tallo-bucle (por ejemplo, de horquilla), con lo que la producción del siARN etiquetado para un polinucleótido de plaga de coleópteros nativo es reforzada por la coexpresión de un fragmento del gen etiquetado, por ejemplo

sobre un casete adicional que puede expresarse en la planta, que conduce a una producción incrementada de siARN, o reduce la metilación de manera de definir el silenciamiento génico transcripcional del promotor de horquilla de dsARN.

5 Las modalidades de la invención incluyen la introducción de una molécula recombinante de ácido nucleico de la presente invención en una planta (es decir, una transformación) para lograr elevados niveles de protección contra la plaga de coleópteros, mediante la expresión de una o más moléculas de iARN. Una
10 molécula de ADN recombinante puede ser por ejemplo un vector, tal como un plásmido circular, lineal o cerrado. El sistema del vector puede ser vector o plásmido simple, dos o más vectores o plásmidos que conjuntamente contienen el ADN total que debe ser introducido en el genoma de un anfitrión. Además, un vector puede ser un vector
15 de expresión. Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser, por ejemplo, adecuadamente insertados en un vector bajo el control de un promotor adecuado que funciona en uno o más anfitriones de manera de impulsar la expresión de un polinucleótido de codificación ligado u otro elemento de ADN. Para esta finalidad hay muchos
20 vectores adecuados, y la selección del vector adecuado dependerá principalmente de la magnitud del ácido nucleico que debe ser insertado en el vector de la célula en particular que debe ser transformado con el vector. Cada vector contiene varios componentes que dependen de su función (por ejemplo, la
25 amplificación del ADN o la expresión del ADN) y de la célula

hospedadora particular con el que es compatible.

A efectos de impartir una protección contra la plaga de coleópteros a una planta transgénica, es por ejemplo posible transcribir un ADN recombinante en una molécula de iARN (por ejemplo, una molécula de ARN que forma una molécula de dsARN) dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante. Una molécula de iARN puede comprender un polinucleótido que es sustancialmente homólogo y específicamente hibridable a un polinucleótido transcrito correspondiente dentro de una plaga de coleópteros que puede causar daño a la especie de planta anfitrión. La plaga de coleópteros puede entrar en contacto con la molécula que está transcrita en células de la planta anfitrión transgénica, por ejemplo, mediante la ingestión de células o fluidos de la planta anfitrión transgénica que comprende la molécula de iARN. Por lo tanto, en ejemplos particulares, la expresión de un gen diana es suprimida por la molécula de iARN dentro de la plaga de coleópteros que infestan la planta anfitrión transgénica. En algunas modalidades, la supresión de la expresión del gen diana en la plaga de coleópteros puede tener como resultado que la planta queda protegida contra ataques de la plaga.

A efectos de permitir el suministro de las moléculas de iARN a una plaga de coleópteros en una relación nutricional con una célula de planta que ha sido transformada con una molécula recombinante de ácido nucleico de la invención, se requiere la expresión (es decir, la transcripción) de las moléculas de iARN en la célula de la planta.

Por lo tanto, una molécula recombinante de ácido nucleico puede comprender un polinucleótido de la invención operativamente ligado a uno o más elementos reguladores, tales como un elemento promotor heterólogo que funciona en una célula hospedadora, tal como una célula bacteriana en donde la molécula de ácido nucleico debe ser ampliada, y una célula de planta en donde debe expresarse la molécula de ácido nucleico.

Los promotores adecuados para ser utilizados en las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen aquellos que son inducibles, virales, sintéticos, o constitutivos, todos los cuales son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes en donde se describen tales promotores incluyen las patentes de Estados Unidos Nos. 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 CaMV 35S); 6,433,252 (Promotor L3 oleosina del maíz); 6,429,357 (promotor actina 2 del arroz; e intrón de actina 2 del arroz); 6,294,714 (promotores inducibles por la luz); 6,140,078 (promotores inducibles por la sal); 6,252,138 (promotores inducibles por agentes patógenos); 6,175,060 (promotores inducibles por deficiencia de fósforo); 6,388,170 (promotores bidireccionales); 6,635,806 (promotor gamma-coxina); y la publicación de patente de Estados Unidos N°. 2009/757,089 (promotor aldolasa de cloroplasto del maíz). Los promotores

adicionales incluyen el promotor nopalina sintasa (NOS, por sus siglas en inglés) (Ebert *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745-9) y los promotores octopina sintasa (OCS, por sus siglas en inglés) (que son llevados sobre plásmidos inductores de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*); los promotores de caulimovirus tales como el virus 19S mosaico del coliflor (CaMV) (Lawton *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. 9:315-24); el promotor CaMV 35S (Odell *et al.* (1985) Nature 313:810-2; el promotor 3t5rS de virus mosaico de escrofilaria (Walker *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19):6624-8); el promotor de sacarosa sintasa (Yang y Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-8); el promotor del complejo del gen R (Chandler *et al.* (1989) Plant Cell 1:1175-83); el promotor del gen ligación a clorofila a/b; el CaMV 35S (patentes de Estados Unidos Nos. 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142 y 5,530,196); el FMV 35S (patentes de Estados Unidos Nos. 6,051,753 y 5,378,619); un promotor PC1SV (patente de Estados Unidos N°. 5,850,019); el promotor SCP1 (patente de Estados Unidos N°. 6,677,503); y los promotores AGRtu.nos (número de acceso GenBank™ V00087; Depicker *et al.* (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:561-73; Bevan *et al.* (1983) Nature 304:184-7).

En modalidades particulares, las moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden un promotor para tejidos específicos, tal como un promotor específico para raíces. Los promotores específicos para las raíces impulsan la expresión de los polinucleótidos de codificación operativamente ligados de manera

exclusiva o preferible en el tejido de las raíces. Los ejemplos de promotores específicos para las raíces son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,110,732; 5,459,252 y 5,837,848; y Opperman *et al.* (1994) *Science* 263:221-3; y Hirel *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 20:207-18. En algunas modalidades, un polinucleótido o fragmento para el control de la plaga de coleópteros de acuerdo con la invención puede ser clonado entre dos promotores específicos para raíces orientados en direcciones transcripcionales opuestas con respecto al polinucleótido o fragmento, y que son operables en una célula de planta transgénica y expresan en ella de manera de producir moléculas de ARN en la célula de planta transgénica, como se describe con anterioridad. Las moléculas de iARN expresadas en los tejidos de planta pueden ser ingeridas por una plaga de coleópteros de manera tal que se logre la supresión de la expresión del gen diana.

Los elementos reguladores adicionales que pueden estar operativamente ligados a un ácido nucleico incluyen los 5'UTR situados entre un elemento promotor y polinucleótido de codificación que funciona como un elemento de encabezamiento de traducción. El elemento de encabezamiento de traducción se halle presente en el mARN completamente procesado, y puede afectar el procesamiento del transcripto primario y/o la estabilidad del ARN. Los ejemplos de elementos de encabezamiento de producción incluyen los encabezamientos de proteínas de choque térmico de maíz y petunia (patente de Estados Unidos N°. 5,362,865), encabezamientos

proteína de recubrimiento de virus de planta, encabezamientos rubisco de planta, y otros. Ver, por ejemplo, Turner y Foster (1995) Molecular Biotech. 3(3):225-36. Los ejemplos no limitantes de 5'UTRs incluyen GmHsp (patente de Estados Unidos N°. 5,659,122);
 5 PhDnaK (patente de Estados Unidos N°. 5,362,865); AtAnt1; TEV (Carrington y Freed (1990) J. Virol. 64:1590-7); y AGRtunos (número de acceso GenBank™ V00087; y Bevan *et al.* (1983) Nature 304:184-7).

Los elementos reguladores adicionales que pueden estar
 10 operativamente ligados a un ácido nucleico también incluyen elementos 3' no traducidos, regiones de terminación de transcripción 3', o regiones de poliadenilación. Se trata de elementos genéticos situados cadena abajo de un polinucleótido, e incluyen polinucleótidos que proveen una señal de poliadenilación y/u otras
 15 señales reguladoras capaces de afectar la transcripción o procesamiento del mRNA. La señal de poliadenilación funcione plantas de manera de causar la adición de los nucleótidos poliadenilados al extremo 3' del precursor de mRNA. El elemento de poliadenilación puede ser derivado de una variedad de genes de
 20 planta, o de genes T-ADN. Un ejemplo no limitante de una región determinación de transcripción 3' es la región 3' de la nopalina sintasa (nos 3'; Fraley *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7). Un ejemplo de el uso de diferentes regiones no traducidas 3' se provee en Ingelbrecht *et al.*, (1989) Plant Cell 1:671-
 25 80. Los ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación incluye

uno de los siguientes: el gen RbcS2 de *Pisum sativum* (Ps.RbcS2-E9; Coruzzi *et al.* (1984) EMBO J. 3:1671-9) y el AGRtu.nos (número de acceso GenBank™ E01312).

Algunas modalidades pueden incluir un vector de
5 transformación de planta que comprende una molécula de ADN
aislada y purificada que comprende por lo menos uno de los
elementos reguladores anteriormente descritos operativamente
ligado a uno o más nucleótidos de la presente invención. Cuando se
expresan, el uno o más polinucleótidos resultan en una o más
10 moléculas de iARN que comprenden un polinucleótido que es
específicamente complementario con respecto a la totalidad o parte
de una molécula de ARN nativa en una plaga de coleópteros. Por lo
tanto, el o los polinucleótidos pueden comprender un segmento que
codifica la totalidad o parte de un polinucleótido presente dentro del
15 transcrito de ARN de la plaga de coleópteros etiquetados, y puede
comprender repeticiones invertidas de la totalidad o parte de un
transcrito de plaga dirigida. Un vector de transformación de planta
puede contener polinucleótidos específicamente complementarios
con respecto a uno o más polinucleótidos diana, por lo que permite
20 la producción de más de una dsARN para inhibir la expresión de dos
o más genes en las células de una o más poblaciones o especies de
insectos plaga diana. Los segmentos de polinucleótidos
específicamente complementarios con respecto a los polinucleótidos
presentes en diferentes genes pueden ser combinados en una única
25 molécula compuesta de ácido nucleico para su expresión en una

planta transgénica. Tales segmentos pueden ser contiguos o estar separados por un ligador.

En otras modalidades, un plásmido de la presente invención que ya contiene por lo menos uno o más polinucleótidos de la invención puede ser modificado mediante la inserción secuencial de uno o más polinucleótidos adicionales en el mismo plásmido, en donde el o los polinucleótidos adicionales están operables ligados a los mismos elementos reguladores que los mismos uno o más polinucleótidos originales. En algunas modalidades, puede diseñarse una molécula de ácido nucleico para la inhibición de múltiples genes diana. En algunas modalidades, los múltiples genes a ser inhibidos pueden obtenerse de la misma especie de plaga de coleópteros, lo que puede reforzar la efectividad de la molécula de ácido nucleico. En otras modalidades, los genes pueden estar derivados de diferentes insectos plaga (por ejemplo, coleópteros plaga), lo que puede ampliar el espectro de plagas contra las cuales el o los agentes son efectivos. Cuando se apunten a múltiples genes para la supresión o para una combinación de expresión y supresión, es posible diseñar un elemento de ADN policistrónico.

Una molécula recombinante de ácido nucleico o vector de la presente invención puede comprender un marcador seleccionable que confiere un fenotipo seleccionable sobre una célula transformada, tal como una célula de planta. También pueden utilizarse marcadores seleccionables para seleccionar plantas o células de plantas que comprenden una molécula recombinante de

ácido nucleico de la invención. El marcador puede codificar una resistencia a los biocidas, una resistencia a los antibióticos (por ejemplo, canamicina, geneticina (G418), bleomicina, higromicina, etc.), o una tolerancia a los herbicidas (por ejemplo, glifosato, etc.).

5 Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen sin limitación: Un gen neo que codifica la resistencia contra la cara misiva y que puede seleccionarse para utilizar canamicina, G418, etc.; un gen bar que codifica la resistencia contra el bialafos; un gen de EPSP sintasa un tasa que codifica la tolerancia al glifosato; un gen nitrilase que
10 confiere una resistencia al bromoxinilo; un gen mutante de acetolactato sintasa (*ALS*, por sus siglas en inglés) que confiere una tolerancia frente a la sulfonilurea; y un gen DHFR resistente al metotrexato. Se dispone de múltiples marcadores seleccionables que concierne una resistencia a la ampicilina, bleomicina, cloranfenicol,
15 gentamicina, higromicina, canamicina, lincomicina, metotexato, fosfinotricina, puromicina, espectinomicina, rifampicina, estreptomycin y tetraciclina, y similares. Ejemplos de tales marcadores seleccionables ilustran en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5,550,318; 5,633,435; 5,780,708 y 6,118,047.

20 Una molécula recombinante de ácido nucleico o vector de la presente invención también puede incluir un marcador seleccionable. Los marcadores seleccionables pueden utilizarse para supervisar la expresión. Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen un gen β -glucuronidasa o *uidA* (GUS, por sus siglas en inglés) que
25 codifica una enzima para la cual se conocen diversos sustratos

cromogénicos (Jefferson *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405); un gen R-locus, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en los tejidos de planta (Dellaporta *et al.* (1988) "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon tagging with Ac." In 18th Stadler Genetics Symposium, P. Gustafson y R. Appels, eds. (New York: Plenum), pp. 263-82); un gen β -lactamasa (Sutcliffe *et al.* (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3737-41); un gen que codifica un enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina); un gen de luciferasa (Ow *et al.* (1986) Science 234:856-9); un gen *xyIE* que codifica una catecol dioxigenasa que puede corregir catecoles cromogénicos (Zukowski *et al.* (1983) Gene 46(2-3):247-55); un gen de amilasa (Ikatu *et al.* (1990) Bio/Technol. 8:241-2); un gen de tirosinasa que codifica una enzima capaz de oxidar la tirosina de manera de obtener DOPA y dopaquinona que a su vez se condensa de manera de obtener melanina (Katz *et al.* (1983) J. Gen. Microbiol. 129:2703-14); y una α -galactosidasa.

En algunas modalidades, es posible utilizar moléculas recombinantes de ácido nucleico, como arriba descrito, en métodos para la creación de plantas transgénicas y para la expresión de ácidos nucleicos heterólogos en plantas para preparar plantas transgénicas que presenten una sensibilidad reducida frente a las plagas de coleópteros. Los vectores de transformación de plantas pueden prepararse por ejemplo, insertando moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de iARN en vectores de

transformación de plantas, introduciéndose éstos en las plantas.

Los métodos adecuados para la transformación de células anfitrión incluyen cualquier método mediante el que es posible introducir ADN en una célula, tales como mediante la transformación de protoplastos (Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.508.184), mediante captación de ADN mediante desecación/inhibición (Ver, por ejemplo, Potrykus *et al.* (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183-8), mediante electroporación (Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5,384,253), mediante agitación con fibras de carburo de silicio (ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5,302,523 y 5,464,765), mediante transformación mediada por *Agrobacterium* (Ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5,563,055; 5,591,616; 5,693,512; 5,824,877; 5,981,840; y 6,384,301) y mediante aceleración de partículas recubiertas con ADN (Ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5,015,580; 5,550,318; 5,538,880; 6,160,208; 6,399,861; y 6,403,865), etc. Técnicas que son particularmente útiles para transformar el maíz se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 7,060,876 y 5,591,616; y en la publicación PCT internacional WO95/06722. Por medio de la aplicación de técnicas tales como éstas, es posible transformar establemente las células de virtualmente cualquier especie. En algunas modalidades, el ADN en transformación se integra en el genoma de la célula hospedadora. En el caso de especies multicelulares, las células transgénicas pueden ser regeneradas en forma de un organismo transgénico. Cualquiera

de estas técnicas puede ser utilizada para producir una planta transgénica, por ejemplo, que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican una o más moléculas de iARN en el genoma de la planta transgénica.

5 El método más ampliamente utilizado para introducir un vector de expresión en las plantas se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium*. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias del suelo patógenas para las plantas que genéticamente transforman células de plantas. Los plásmidos Ti y Ri de *A.*
10 *tumefaciens* y de *A. rhizogenes*, respectivamente, transportan genes que son responsables de la transformación genética de la planta. Los plásmidos Ti (que inducen tumores) contienen un gran segmento, conocido como T-ADN, que es transferido a las plantas transformadas. Otro segmento del plásmido Ti, la región Vir, es
15 responsable de la transferencia de T-ADN. La región T-ADN está rodeada por repeticiones terminales. En los vectores binarios modificados, los genes inductores de tumores han sido suprimidos, y se utilizan las funciones de la región Vir para transferir ADN extraño o rodeado por elementos de borde de T-ADN. La región T también
20 puede contener un marcador seleccionable para la recuperación eficiente de células y plantas transgénicas, y un sitio de clonación múltiple para insertar polinucleótidos para la transferencia tal como un ácido nucleico que codifica dsARN.

Por lo tanto, en algunas modalidades, se deriva un vector de
25 transformación de planta de un plásmido Ti de *A. tumefaciens* (Ver,

por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4,536,475, 4,693,977, 4,886,937 y 5,501,967; y la patente europea N°. EP 0 122 791) o un plásmido de *A. rhizogenes*. Los vectores de transformación de plantas adicionales incluyen, por ejemplo y sin limitación, los descritos por Herrera-Estrella *et al.* (1983) Nature 303:209-13; Bevan *et al.* (1983) Nature 304:184-7; Klee *et al.* (1985) Bio/Technol. 3:637-42; y en la patente Europea No. EP 0 120 516, y aquellos derivados de cualquiera de los precedentes. Otras bacterias tales como *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, y *Mesorhizobium* que interactúan de manera natural con las plantas pueden ser modificadas para mediar la transferencia de los genes a un número de diversas plantas. Estas bacterias simbióticas asociadas pueden hacerse competentes para la transferencia de genes mediante la adquisición tanto de un plásmido Ti desarmado y un vector binario adecuado.

Después de proveer ADN exógeno a células receptoras, las células transformadas se identifican en términos generales para su cultivo ulterior y para la generación de plantas. A efectos de mejorar la capacidad de identificar células transformadas, puede ser deseable utilizar un gen seleccionable o un marcador seleccionable, como anteriormente indicado, utilizándose el vector de transformación para generar el transformante. En el caso el que se utilice un marcador seleccionable, las células transformadas se identifican dentro de la población de células potencialmente transformadas mediante la exposición de las células a uno o más agentes selectivos. En el caso de utilizarse un marcador

seleccionable, las células pueden ser seleccionadas en base al rasgo del marcador deseado.

Las células que sobrevivan al agente selectivo, o las células que dieron un puntaje positivo en el ensayo de selección, pueden ser
5 cultivadas en un medio que soporte la regeneración de plantas. En algunas modalidades, cualquier medio de cultivo adecuado para los tejidos de planta (por ejemplo, medios MS y N6) puede ser modificado mediante la inclusión de otras sustancias, tales como reguladores del crecimiento. Los tejidos pueden ser mantenidos en
10 un medio básico con regulador del crecimiento hasta que se disponga de suficiente tejido para empezar los esfuerzos para la regeneración de la plantas, después de rondas selectivas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración (por ejemplo, por lo menos 2 semanas),
15 después de lo cual se transfiere a un medio conductivo para la formación de los brotes. Los cultivos son transferidos periódicamente hasta que haya tenido lugar una formación suficiente de los brotes. Una vez que los brotes se han formado, se los transfiere a un medio conductivo para la formación de las raíces. Una vez que se hayan
20 obtenido suficientes raíces, es posible transferir las plantas a un suelo para su crecimiento y maduración ulteriores.

Para confirmar la presencia de una molécula de ácido nucleico de interés (por ejemplo, un ADN que codifica una o más moléculas de iARN que inhiben la expresión de los genes diana en una planta
25 de coleópteros) en las plantas en regeneración, se puede llevar a

cabo una variedad de ensayos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo ensayos de biología molecular, tales como transferencia de tipo Southern y de tipo Northern, PCR, y secuenciación de ácido nucleico; ensayos bioquímicos tales como la detección de la presencia de un producto proteína, por ejemplo, mediante medios inmunológicos (ELISA y/o transferencias de tipo Southern) o mediante función enzimática; ensayos efectuados sobre partes de las plantas tales como ensayos sobre hojas y raíces; y análisis del fenotipo de la totalidad de la planta regenerada.

Los eventos de integración pueden ser analizados, por ejemplo, mediante amplificación por PCR utilizándose, por ejemplo, cebadores oligonucleótidos específicos para una molécula de ácido nucleico de interés. Se entiende que la genotificación incluye sin limitación, amplificación por reacción de cadena de polimerasa (PCR) de gADN derivado de tejido de callos de plantas anfitrión aislados de los que se predice que contienen una molécula de ácido nucleico de interés integrado en el genoma, seguido por clonación estándar y análisis de secuencias de productos de amplificación de PCR. Los métodos para la genotipificación de PCR han sido bien descritos (por ejemplo, Rios, G. *et al.* (2002) Plant J. 32:243-53) y puede ser aplicados a gADN derivado de cualquier especie de plantas (por ejemplo, *Z. mays*) o tipo de tejido, lo incluye los cultivos de células.

Una planta transgénica formada utilizando métodos de transformación dependientes de *Agrobacterium* típicamente contiene un único ADN recombinante insertado en un cromosoma. El

polinucleótido del único ADN recombinante se refiere a la denominación de “acontecimiento transgénico” o de “acontecimiento de integración”. Tales plantas transgénicas son heterocigóticas con respecto al polinucleótido exógeno insertado. En algunas modalidades, una planta transgénica que es homocigótica con respecto a un transgén puede obtenerse mediante el apareamiento sexual de una planta transgénica segregante independiente que contiene un único gen exógeno consigo mismo, por ejemplo una planta T0, para producir semillas T1. Un cuarto de la semilla T1 producida será homocigótica con respecto al transgén. La semilla T1 germinante da como resultado plantas que pueden ser sometidas a ensayo para establecer su carácter heterocigótico, típicamente utilizando un ensayo SNP o un ensayo de amplificación térmica que permite distinguir entre heterocigotos y homocigotos (es decir, un ensayo de cigosidad).

En modalidades particulares, se producen por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más moléculas de iARN diferentes en una célula de planta que tienen un efecto de protección contra la plaga de coleópteros. Las moléculas de iARN (por ejemplo, las moléculas ARN) pueden ser expresados a partir de múltiples ácidos nucleicos introducidos en diferentes acontecimientos de transformación, o de un único ácido nucleico introducido en un único acontecimiento de transformación. En algunas modalidades, una pluralidad de moléculas de iARN es expresada bajo el control de un único promotor. En otras modalidades, una pluralidad de ácidos nucleicos

son expresados bajo el control de múltiples promotores. Pueden expresarse moléculas de iARN individuales que comprenden múltiples polinucleótidos cada uno de los cuales es homólogo con respecto a diferentes lugares dentro de una o más plagas de coleópteros (por ejemplo, los lugares definidos por la SEC ID NO: 1 o por la SEC ID NO: 87), ambos en diferentes poblaciones de las mismas especies de plaga de coleópteros, o en diferentes especies de plaga de coleópteros.

Además de la transformación directa de una planta con una molécula recombinante de ácido nucleico, es posible preparar plantas transgénicas mediante el cruce una primera planta que tiene por lo menos un evento transgénico con una segunda planta que carezca de un acontecimiento tal. Por ejemplo, una molécula recombinante de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de iARN puede ser introducida en una primera línea de plantas que es adecuada para ser transformada de manera de producir a planta transgénica, la cual planta transgénica puede ser cruzada con una segunda línea de planta para introgresar el polinucleótido que codifica la molécula de iARN en la segunda línea de planta.

La invención también incluye productos comercializables que contienen una o más de las secuencias de la presente invención. Las modalidades particulares incluyen productos comerciales producidos a partir de una planta o semilla recombinantes que contenga una o más de las secuencias de nucleótidos de la presente invención. La

expresión “producto comercial que contenga una o más de las secuencias de la presente invención” tiene prospecto incluir sin limitación: harinas, aceites, granos enteros o molidos de una planta, o cualquier alimento de consumo humano o producto de consumo animal que comprenda cualquiera de lo siguiente: harinas, aceites, granos enteros o molidos de una planta o semilla recombinante que contengan una o más de las secuencias de la presente invención. La detección de uno o más de los polinucleótidos de la presente invención en uno o más productos comercializables considerados en la presente es una evidencia de facto que el producto comercial ha sido producido a partir de una planta transgénica destinada a expresar una o más de los polinucleótidos de la presente invención a los fines de controlar los insectos plaga utilizando métodos de supresión de genes mediada por dsARN.

En algunos aspectos, se incluyen semillas y productos comercializables producidos mediante plantas transgénicas derivadas de células de plantas transformadas, en donde las semillas o productos comerciales comprenden una cantidad detectable de un ácido nucleico de la invención. En algunas modalidades, dichos productos comercializables pueden ser producidos por ejemplo obteniendo plantas transgénicas y preparando alimentos de consumo humano o animal a partir de estas. Los productos comerciales que comprenden uno o más de los polinucleótidos de la invención incluyen, por ejemplo y sin limitación: harinas, aceites, granos o semillas enteros o molidos de una planta, y cualquier producto

alimentos de consumo humano que comprenda cualquiera de los siguientes: harinas, aceites, granos o semillas enteros o molidos de una planta que comprende uno o más de los ácidos de la invención. La detección uno o más de los polinucleótidos de la invención en uno
5 o más productos comerciales es una evidencia de facto que el producto comercial ha sido producido a partir de una planta transgénica diseñada para expresar una o más de las moléculas de iARN de la invención a los fines de controlar las plagas de coleóptero.

10 En algunas modalidades, una planta o semilla transgénicas que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención también pueden comprender por lo menos otro evento transgénico en su genoma, lo que incluye sin limitación: Un evento transgénico del que se transcribe una molécula de iARN que apunta a un lugar en un
15 insecto plaga distinto de los definidos por las SEC ID NOs: 1, 3 y 67; un evento transgénico del que está transcrita una molécula de iARN que apunta a un gen en un organismo distinto de la plaga de coleópteros (por ejemplo, un nematodo que parasita las plantas); un gen que codifica una proteína insecticida (por ejemplo, una proteína
20 insecticida de *Bacillus thuringiensis*); un gen de tolerancia a los herbicidas (por ejemplo, un gen que provee una tolerancia al glifosato); y un gen que contribuya a un fenotipo deseable en la planta transgénica, tales como un mayor rendimiento, metabolismo de ácidos grasos alterado, o restauración de la esterilidad masculina
25 citoplásmica). En modalidades particulares, los polinucleótidos que

codifican moléculas de iARN de la invención pueden ser combinados con otros rasgos de control de insectos y de enfermedades en una planta a efectos de lograr un mayor control de la vulnerabilidad de las plantas frente a las enfermedades y del daño infligido por los insectos. La combinación de los rasgos del control de los insectos que utilizan distintos modos de acción puede proveer a las plantas transgénicas protegidas una durabilidad superior con respecto a las plantas que alojan un único rasgo de control, debido a la menor probabilidad que en el campo se desarrolle una resistencia al o a los rasgos.

V. Supresión del gen diana en una plaga de coleópteros

A. Generalidades

En algunas modalidades de la invención, por lo menos una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de coleópteros puede ser provista a una plaga de coleópteros, en donde la molécula de ácido nucleico conduce a silenciamiento de los genes, mediado por ARNi, en la plaga. En modalidades particulares, una molécula de iARN (por ejemplo, dsARN, siARN, miARN, shARN, y hpARN) puede ser provista a la plaga de coleópteros. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de coleópteros puede ser provista a una plaga mediante la puesta en contacto de la molécula de ácido nucleico con la plaga. En estas modalidades y en otras, una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de coleópteros puede ser provista en un sustrato para la alimentación de la plaga, por ejemplo, una

composición nutricional. En estas modalidades y en otras, una molécula de ácido nucleico útil para el control de una plaga de coleópteros puede ser provista mediante la ingesta de un material de planta que comprende la molécula de ácido nucleico que es ingerida por la plaga. En determinadas modalidades, la molécula de ácido nucleico se halla presente en material de planta mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante introducido en el material de planta, por ejemplo, mediante la transformación de una célula de planta con un vector que comprende el ácido nucleico recombinante y la regeneración de un material de planta o de una planta entera a partir de la célula de planta transformada.

B. Supresión de genes mediada por ARNi

En modalidades particulares, la invención provee moléculas de iARN (por ejemplo, dsARN, siARN, miARN, shARN, y hpARN) que pueden estar diseñadas para apuntar a polinucleótidos nativos esenciales (por ejemplo, genes esenciales) en el transcriptoma de una plaga de coleópteros (por ejemplo, WCR o NCR), por ejemplo mediante el diseño de una molécula de iARN que comprende por lo menos una cadena que comprende un polinucleótido que es específicamente complementario con respecto al polinucleótido diana. La secuencia de una molécula de iARN así diseñada puede ser idéntica a la del polinucleótido diana, o puede incorporar faltas de concordancia que no impidan una hibridación específica entre la molécula de iARN y su polinucleótido diana.

Las moléculas de iARN de la invención pueden utilizarse en

métodos para la supresión de genes en una plaga de coleópteros, con lo que se reduce el nivel o incidencia del daño causada por la plaga en una planta (por ejemplo, una planta transformada protegida que comprende una molécula de iARN). Tal como se la utiliza en la presente, la expresión “supresión de genes” se refiere a cualquiera de los métodos bien conocidos para reducir los niveles de proteína producidos como resultado de la transcripción de genes a mRNA y subsiguiente traducción del mRNA, lo que incluye la reducción de la expresión de proteína de un gen o de un polinucleótido de codificación que incluye la inhibición postranscripcional de la expresión y la supresión transcripcional. La inhibición postranscripcional es mediada mediante homología específica entre la totalidad o parte de un mRNA transcrito de un gen etiquetado para su supresión y la correspondiente molécula de iARN utilizada para la supresión. Adicionalmente, la expresión “inhibición postranscripcional” se refiere a la reducción sustancial y medible de la cantidad de mRNA disponible en la célula para su ligación por los ribosomas.

En determinadas modalidades en las que una molécula de iARN es una molécula de dsARN, la molécula de dsARN puede ser escindida por la enzima, DICER, en moléculas de siARN cortas (de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud). La molécula de siARN doble generada por la actividad de DICER sobre la molécula de dsARN puede ser separada en dos siARNs de cadena simple; la “cadena pasajera” y la “cadena guía”. La cadena pasajera puede ser

degradada, y la cadena guía puede ser incorporada en RISC. La inhibición postranscripcional tiene lugar mediante hibridación específica de la cadena guía con un polinucleótido específicamente complementario de una molécula de mRNA, y subsiguiente escisión por la enzima, Argonaute (componente catalítico del complejo RISC).

En algunas modalidades de la invención, puede utilizarse cualquier forma de molécula de iARN. Las personas expertas en la técnica comprenderán que las moléculas de dsARN típicamente son más estables durante la preparación y durante la etapa de la provisión de la molécula de iARN a una célula que las moléculas de ARN doble, y típicamente son también estables en una célula. Por lo tanto, si bien las moléculas de siARN y de miARN, por ejemplo, pueden ser igualmente efectivas en algunas modalidades, es posible elegir una molécula de dsARN debido a su estabilidad.

En modalidades particulares, se provee una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido, y este polinucleótido puede ser expresado *in vitro* para producir una molécula de iARN es sustancialmente homóloga con respecto a una molécula de ácido nucleico codificada por un polinucleótido dentro del genoma de una plaga de coleópteros. En determinadas modalidades, la molécula de iARN transcrita *in vitro* puede ser una molécula de dsARN estabilizada que comprende una estructura de tallo-bucle. Después de que una plaga de coleópteros haya entrado en contacto con la molécula de iARN transcrita *in vitro*, puede presentarse la inhibición postranscripcional de un gen diana en la plaga (por ejemplo, un gen

esencial).

En algunas modalidades de la invención, la expresión de un iARN a partir una molécula de ácido nucleico que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos (por ejemplo, por lo menos 19 nucleótidos contiguos) de un polinucleótido se utiliza en un método para la inhibición postranscripcional de un gen diana en una plaga de coleópteros, en donde se selecciona el polinucleótido de entre el grupo que consiste en: la SEC ID NO:1; el complemento de la SEC ID NO:1; la SEC ID NO:3; el complemento de la SEC ID NO:3; la SEC ID NO:67; el complemento de la SEC ID NO:67; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC ID NO:1; el fragmento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC ID NO:1; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC ID NO:3; el fragmento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC ID NO:3; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC ID NO:67; el fragmento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC ID NO:67; un polinucleótido de codificación nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:1; el complemento de un polinucleótido codificador nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:1; un polinucleótido de codificación nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:3; el complemento de un polinucleótido codificador nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:3; un polinucleótido de codificación nativo de un organismo

Diabrotica que comprende la SEC ID NO:67; el complemento de un polinucleótido codificador nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:67; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido de codificación nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:1; el
 5 fragmento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido de codificación nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:1; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido de codificación nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:3; el
 10 fragmento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido de codificación nativo de un organismo a *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:3; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido de codificación nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:67;
 15 y el fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido de codificación nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:67. En determinadas modalidades, puede utilizarse la expresión de una molécula de ácido nucleico que tiene
 20 una identidad de por lo menos aproximadamente 80% (por ejemplo, del 79%, de aproximadamente 80%, de aproximadamente 81%, de aproximadamente 82%, de aproximadamente 83%, de aproximadamente 84%, de aproximadamente 85%, de aproximadamente 86%, de aproximadamente 87%, de
 25 aproximadamente 88%, de aproximadamente 89%, de

aproximadamente 90%, de aproximadamente 91%, de
aproximadamente 92%, de aproximadamente 93%, de
aproximadamente 94%, de aproximadamente 95%, de
aproximadamente 96%, de aproximadamente 97%, de
5 aproximadamente 98%, de aproximadamente 99%, de
aproximadamente 100%, y del 100%) con cualquiera de los
precedentes. En estas modalidades y en otras, puede expresarse
una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente a una
molécula de ARN presente en por lo menos una célula de una plaga
10 de coleópteros.

Un rasgo importante de algunas modalidades de la presente es
que el sistema de inhibición postranscripcional de ARNi tiene la
capacidad de tolerar variaciones de secuencia entre los genes diana
de los que cabría prever que se deben a mutación genética,
15 polimorfismo de las cepas, o divergencia evolucionaria. Es posible
que no sea necesario que la molécula de ácido nucleico introducida
sea absolutamente homóloga ni con un producto de transcripción
primario ni con un mRNA completamente procesado de un gen diana,
siempre y cuando la molécula de ácido nucleico introducida sea
20 específicamente hibridable con sea un factor de transcripción
primario sea un mRNA completamente procesado del gen diana.
Además, puede que no sea necesario que la molécula de ácido
nucleico introducida sea de longitud completa, en comparación con
sea un producto de transcripción primario sea con un mRNA
25 completamente procesado del gen diana.

La inhibición de un gen diana mediante la técnica de iARN de la presente invención es específica con respecto a las secuencias; es decir, para la inhibición genética se apunta a polinucleótidos sustancialmente homólogos con respecto a la o a las moléculas de iARN. En algunas modalidades, puede utilizarse una molécula de ARN que tiene una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la de una porción de un gen diana. En estas modalidades y en otras, puede utilizarse una molécula de ARN que comprenda un polinucleótido con una o más inserciones, supresiones y/o mutaciones de punto referidas a un polinucleótido diana. En modalidades particulares, una molécula de iARN y una porción de un gen diana pueden compartir, por ejemplo, una identidad de secuencias de por lo menos aproximadamente 80%, de por lo menos aproximadamente 81%, de por lo menos aproximadamente 82%, de por lo menos aproximadamente 83%, de por lo menos aproximadamente 84%, de por lo menos aproximadamente 85%, de por lo menos aproximadamente 86%, de por lo menos aproximadamente 87%, de por lo menos aproximadamente 88%, de por lo menos aproximadamente 89%, de por lo menos aproximadamente 90%, de por lo menos aproximadamente 91%, de por lo menos aproximadamente 92%, de por lo menos aproximadamente 93%, de por lo menos aproximadamente 94%, de por lo menos aproximadamente 95%, de por lo menos aproximadamente 96%, de por lo menos aproximadamente 97%, de por lo menos aproximadamente 98%, de por lo menos

aproximadamente 99%, de por lo menos aproximadamente 100%, y 100%. Como alternativa, la región dúplex de una molécula de dsARN puede ser específicamente hibridable con una porción de un transcrito de gen diana. En moléculas específicamente hibridables, un polinucleótido de una longitud inferior a la longitud completa, que presente una homología superior, compensa un polinucleótido más largo y menos homólogo. La longitud del polinucleótido de una región dúplex de una molécula de dsARN que es idéntica a una porción de un transcrito de gen diana puede tener por lo menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, o por lo menos aproximadamente 1,000 bases. En algunas modalidades, puede utilizarse un polinucleótido de más de 20 nucleótidos, por ejemplo, un polinucleótido de 100-200 o 300-500 nucleótidos. En modalidades particulares, puede utilizarse un polinucleótido de más de aproximadamente 200-300 nucleótidos. En modalidades particulares, puede utilizarse un polinucleótido de más de aproximadamente 500-1000 nucleótidos, en base a la magnitud del gen diana.

En determinadas modalidades, es posible inhibir la expresión de un gen diana en una plaga de coleópteros en por lo menos el 10%; por lo menos el 33%; por lo menos el 50%; o por lo menos el 80% dentro de una célula de la plaga, de manera tal que tiene lugar una inhibición significativa. La expresión "inhibición significativa" se refiere a una inhibición superior a un umbral que tiene como resultado un fenotipo detectable (por ejemplo, interrupción de la reproducción, interrupción de la alimentación, interrupción del

desarrollo, etc.), o una disminución detectable en el ARN y/o en el producto génico correspondiente al gen diana que se está inhibiendo. Si bien en determinadas modalidades de la invención, la inhibición tiene lugar sustancialmente en todas las células de la plaga, en otras modalidades la inhibición se presenta solamente en un subconjunto de células que expresan el gen diana.

En algunas modalidades, la supresión transcripcional mediada por la presencia en una célula, de una molécula de dsARN que presenta una sustancial identidad de secuencias con respecto a un ADN promotor o al complemento del mismo de manera de llevar a cabo lo que se llama “trans-supresión del promotor”. La supresión de los genes puede ser efectiva contra genes diana en una plaga de coleópteros que pueda ingerir tales moléculas de dsARN, o entrar en contacto con ellas, por ejemplo, mediante la ingestión de, o puesta en contacto con, material de planta que contiene la molécula de dsARNs. Las moléculas de dsARN para ser utilizadas en la trans-supresión de promotor pueden ser diseñadas específicamente para inhibir o suprimir la expresión de uno o más polinucleótidos homólogos o complementarios en las células de la plaga de coleópteros. La supresión postranscripcional de los genes por un ARN orientado en sentido o antisentido para regular la expresión de los genes en las células de plantas se divulga en las patentes de Estados Unidos 5,107,065; 5,759,829; 5,283,184; y 5,231,020.

C. Expresión de moléculas de iARN provistas a una plaga de coleópteros

La expresión de moléculas de iARN para la inhibición de los genes, mediada por ARNi, en una plaga de coleópteros, puede llevarse a cabo en cualquiera de entre varios formatos *in vitro* o *in vivo*. Las moléculas de iARN pueden ser en tal caso provistas a una

5 plaga de coleópteros, por ejemplo, mediante la puesta en contacto de las moléculas de iARN con la plaga, o haciendo que la plaga ingiera o de alguna otra manera internalice las moléculas de iARN. Algunas modalidades incluyen las plantas anfitriones transformadas de una plaga de coleópteros, células de plantas transformadas, y la

10 progenie de plantas transformadas. Las células de plantas transformadas y las plantas transformadas pueden ser diseñadas a efectos de expresar una o más de las moléculas de iARN, por ejemplo, bajo el control de un promotor heterólogo, de manera de proveer un efecto protector contra las plagas. Por lo tanto, cuando

15 una planta transgénica o célula de planta transgénica es consumida por una plaga de coleópteros durante su alimentación, la plaga puede ingerir moléculas de iARN expresadas en las plantas o células transgénicas. Los polinucleótidos de la presente invención también pueden ser introducidos en una amplia variedad de anfitriones

20 microorganismos procariotas y eucariotas de manera de producir moléculas de iARN. El término “microorganismos” incluye especies procariotas y procariotas, tales como bacterias y hongos.

La modulación de la expresión de los genes puede incluir la supresión parcial o completa de dicha expresión. En otra modalidad,

25 un método para la supresión de la expresión de los genes en una

plaga de coleópteros comprende proveer en el tejido del anfitrión o de la plaga una cantidad supresora de genes, de por lo menos una molécula de dsARN formada después de la transcripción de un polinucleótido como se describe en la presente, de la que por lo menos un fragmento es complementario con respecto a un mARN dentro de las células de la plaga de coleópteros. Una molécula de dsARN, incluyéndose su forma modificada tal como una molécula de siARN, miARN, shARN, o hpARN, ingerida por una plaga de coleópteros puede tener una identidad de por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o aproximadamente 100%, con respecto una molécula de ARN transcrita de una molécula de ADN *hunchback*, por ejemplo, que comprende un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en las SEC ID NO:1, 3 y 67. Por lo tanto se proveen moléculas de ácido nucleico aisladas y sustancialmente purificadas, que incluyen sin limitación, los polinucleótidos de presentación no natural y los constructos de ADN recombinantes para proveer moléculas de dsARN, que suprimen o inhiben la expresión de un polinucleótido de codificación endógeno o de un polinucleótido de codificación diana en una plaga de coleópteros cuando se introduce en éste.

En modalidades particulares se provee un sistema de entrega para la entrega de moléculas de iARN para la inhibición postranscripcional de uno o más genes diana en una plaga de

coleópteros de las plantas y el control de una población de la plaga de plantas. En algunas modalidades, el sistema de entrega comprende la ingesta de una célula de planta transgénica hospedadora o del contenido de la célula hospedadora que comprende moléculas de ARN transcritas en la célula hospedadora. En estas modalidades y en otras, se crea una célula de planta transgénica o una planta transgénica que contiene un constructo de ADN recombinante y que provee una molécula de dsARN estabilizada de la invención. Las células de plantas transgénicas y las plantas transgénicas que comprenden ácidos nucleicos que codifican una molécula de iARN en particular, pueden ser producidas mediante el uso de tecnologías de ADN recombinantes (cuyas tecnologías básicas son bien conocidas en la especialidad) para construir un vector de transformación de planta que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de iARN de la invención (por ejemplo, una molécula de dsARN estabilizada); para transformar una célula de planta o una planta; y para generar la célula de planta transgénica o la planta transgénica que contiene la molécula de iARN transcrita.

Para impartir una protección contra la plaga de coleópteros a una planta transgénica, es posible por ejemplo transcribir una molécula de ADN recombinante en una molécula de iARN, tales como una molécula de dsARN, una molécula de siARN, una molécula de miARN, una molécula de shARN, o una molécula de hpARN. En algunas modalidades, una molécula de ARN transcrita desde una molécula de ADN recombinante puede formar una molécula de

dsARN dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante. Una molécula de dsARN de este tipo puede estar comprendida en una parte de un polinucleótido que es idéntico a un polinucleótido correspondiente transcrito de un ADN dentro de una plaga de coleópteros que puede infestar la planta anfitrión. La expresión de un gen diana dentro de la plaga de coleópteros es suprimida por la molécula de dsARN, y la supresión de la expresión del gen diana en la plaga tiene como resultado que la planta transgénica es resistente a la plaga. Los efectos moduladores de las moléculas de dsARN han demostrado ser aplicables a una variedad de genes expresados en plagas, lo que incluye, por ejemplo, genes endógenos responsables de la división celular, remodelación cromosómica, metabolismo celular o de la transformación celular, lo que incluye los genes constitutivos; factores de transcripción, genes relacionados con la muda; y otros genes que codifican polipéptidos que intervienen en el metabolismo celular o en el crecimiento y desarrollo normales.

Para la transcripción de un transgén *in vivo* o de un constructo de expresión, en algunas modalidades puede utilizarse una región reguladora (por ejemplo, un promotor, reforzador, silenciador, y señal de poliadenilación) para transcribir la cadena (o las cadenas) de ARN. Por ello, en algunas modalidades, como se indicó con anterioridad, un polinucleótido destinado a producir moléculas de iARN puede estar operativamente ligado a uno o más elementos promotores funcionales en una célula hospedadora de planta. El promotor puede ser un promotor endógeno, normalmente residente

en el genoma del anfitrión. El polinucleótido de la presente invención, bajo el control de un elemento promotor operativamente ligado, puede además estar flanqueado por elementos adicionales que de manera ventajosa influyen sobre su transcripción y/o sobre la estabilidad de un transcripto resultante. Tales elementos pueden estar situados cadena arriba del promotor operativamente ligado, cadena abajo del extremo 3' del constructo de expresión, y pueden presentarse tanto corriente arriba del promotor como cadena abajo del extremo 3' del constructo de expresión.

En algunas modalidades, la supresión de un gen diana (por ejemplo un gen *hunchback*) tiene como resultado un fenotipo de ARNi parental, un fenotipo que puede observarse en la progenie del sujeto (por ejemplo, una plaga de coleópteros) puesto en contacto con la molécula de iARN. En algunas modalidades, el fenotipo de pARNi comprende hacer que se reduzca la capacidad de la plaga para producir una descendencia viable. En ejemplos particulares de pARNi, un ácido nucleico que inicia el pARNi no incrementa la incidencia de la mortalidad en una población (por ejemplo, en una población adulta de una población total que incluye larvas) en la que se entrega el ácido nucleico. En otros ejemplos de ARNi, un ácido nucleico que inicia pARNi también incrementa la incidencia de la mortalidad en la población en la que se entrega al ácido nucleico.

En algunas modalidades, una población de plagas de coleópteros es puesta en contacto con una molécula de iARN, resultando pARNi, en donde las plagas sobreviven y se aparean pero

producen huevos que son menos capaces de hacer eclosionar una progenie viable que los huevos producidos por las plagas de la misma especie a las que no se han provisto el o los ácidos nucleicos. En algunos ejemplos, tales plagas no depositan huevos o depositan una cantidad de huevos menor de la que es observable en plagas de la misma especie que no han sido puestos en contacto con la molécula de iARN. En algunos ejemplos, los huevos depositados por tales plagas no eclosionan, o eclosionan en un grado que es significativamente inferior al que puede observarse en la plagas de la misma especie que no han sido puestas en contacto con la molécula. En algunos ejemplos, las larvas que eclosionan de huevos depositados por tales plagas no son viables, o son menos viables de lo que puede observarse en las plagas de la misma especie que no han sido puestos en contactos con la molécula de iARN.

Las plantas de cultivo transgénicas que producen sustancias que proveen una protección contra la alimentación por los insectos, son vulnerables a la adaptación de la población de plagas de insectos diana, lo que reduce la durabilidad de los beneficios de la o de las sustancias protectoras contra insectos. Tradicionalmente, los retardos en la adaptación de la plagas insecto frente a las plantas de cultivo transgénicas se obtiene mediante: (1) la plantación de “refugios” (plantas de cultivo que no contienen la o las sustancias pesticidas, y que por lo tanto permiten la supervivencia de los insectos que son vulnerables a la o a las sustancias pesticidas y/o (2) la combinación de sustancia insecticida con múltiples modos de

acción contra los insectos plaga, de manera tal que los individuos que son resistentes a modo de acción son muertos por un segundo modo de acción.

En algunos ejemplos, las moléculas de iARN (por ejemplo, expresadas a partir de un transgén en una planta anfitrión) representan nuevos modos de acción para combinar con la tecnología de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* y/o la técnica de ARNi letal en las pirámides de genes de administración de la resistencia de los insectos, contra el desarrollo de poblaciones de insectos resistentes contra cualquiera de estas tecnologías de control.

En algunas modalidades, el ARNi parental puede resultar en un tipo de control de plagas que es diferente del control obtenido mediante el ARNi letal, y que puede combinarse con ARNi letal de manera de obtener un control sinérgico de la plaga. Por lo tanto, en modalidades particulares, las moléculas de iARN para la inhibición postranscripcional de uno o más genes diana en una plaga de coleópteros de plantas pueden combinarse con otras moléculas de iARN a efectos de obtener un apuntamiento redundante de ARNi y un efecto sinérgico de ARNi.

El ARNi parental (pARNi) que causa la mortalidad de los huevos y la pérdida de viabilidad de los huevos tiene el potencial de aportar otros beneficios de durabilidad a plantas de cultivo transgénicas que utilizan ARNi y otros mecanismos para la protección contra los insectos. El pARNi impide que los insectos

expuestos produzcan una progenie, y que por lo tanto pasen a la siguiente generación cualesquiera alelos de los que son portadores que confieran una resistencia frente a la o a las sustancias plaguicidas. El pARNi es particularmente útil para prolongar la durabilidad de las plantas de cultivo transgénicas protegidas contra los insectos cuando se lo combina con una o más sustancias plaguicidas adicionales que provean una protección contra las mismas poblaciones de plagas. En algunas modalidades, tales sustancias plaguicidas adicionales pueden incluir, por ejemplo, dsARN; dsARN activo contra las larvas; proteínas insecticidas (tales como los derivados de *Bacillus thuringiensis* o de otros organismos); y otras sustancias insecticidas. Este beneficio se presenta porque los insectos que son resistentes a las sustancias plaguicidas se presentan en una mayor proporción de la población en la planta de cultivo transgénica que en la planta del cultivo que oficia de refugio. Si una relación entre los alelos de resistencia y los alelos susceptibles que pasan a la siguiente generación es inferior en la presencia de pARNi que en la ausencia de pARNi, se retardará la evolución de la resistencia.

Por ejemplo, es posible que el pARNi no reduzca el número de individuos en una primera generación de la plaga que está infligiendo un daño en una planta que expresa una molécula de iARN. Sin embargo, la capacidad de tales plagas para mantener una infestación a lo largo de las generaciones subsiguientes puede reducirse. A la inversa, el ARNi letal puede matar plagas que ya están infestando la

planta. Cuando se combina el pARNi con el ARNi letal, las plagas que son puestas en contacto con un iARN parental pueden aparearse con plagas procedentes de fuera del sistema que no han sido puestas en contacto con el iARN; sin embargo, la progenie resultante de un apareamiento de este tipo puede carecer de viabilidad o ser menos viable, por lo que puede ser incapaz de infestar la planta. Al mismo tiempo, las plagas que han sido puestas en contacto con una molécula de iARN letal pueden ser afectadas directamente. La combinación de estos dos efectos puede ser sinérgica, es decir, el efecto de la combinación de pARNi con ARNi letal puede ser mayor que la suma de los efectos de pARNi y ARNi letal considerados independientemente entre sí. El pARNi puede ser combinado con ARNi letal, por ejemplo, por el hecho de proveer una planta que expresa moléculas de iARN tanto letal como parental; por el hecho de proveer en la misma ubicación una primera planta que expresa moléculas de iARN letal y una segunda planta que expresa moléculas de iARN parental y/o mediante la puesta en contacto de plagas hembra y/o macho con la molécula de pARNi, y subsiguientemente se liberan las plagas puestas en contacto en el entorno de la planta, de manera tal que puedan aparearse de manera improductiva con las plagas de la planta.

Algunas modalidades proveen métodos para reducir el daño infligido a una planta anfitrión (por ejemplo, una planta de maíz) causado por una plaga de coleópteros que se alimenta de la planta, en donde el método comprende proveer en la planta anfitrión una

célula de planta transformada que exprese por lo menos una molécula de ácido nucleico de la invención, en donde la o las moléculas de ácido nucleico funcionan al ser incorporadas por la o las plagas de manera de inhibir la expresión de un polinucleótido diana dentro de la o de las plagas, la cual inhibición de la expresión tiene como resultado una reducción de la reproducción, por ejemplo, además de una mortalidad y/o menor crecimiento de la o de las plagas, con lo cual se reduce el daño infligido por la o plaga a la planta anfitrión. En algunas modalidades, la o las moléculas de ácido nucleico comprenden moléculas de dsARN. En estas modalidades y en otras, la o las moléculas de ácido nucleico comprenden moléculas de dsARN cada una de las cuales comprende más de un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros. En algunas modalidades, la o las moléculas de ácido nucleico consisten en un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros.

En otras modalidades, se provee un método para incrementar el rendimiento de un cultivo de maíz, en donde el método comprende introducir en una planta de maíz por lo menos una molécula de ácido nucleico de la invención; y cultivar la planta de maíz de manera de permitir la expresión de una molécula de iARN que comprende el ácido nucleico, en donde la expresión de una molécula de iARN que comprende el ácido nucleico inhibe el daño y/o crecimiento de la

plaga de coleópteros, con lo que se reduce o elimina una pérdida de rendimiento debida a la infestación de la plaga. En algunas modalidades, la molécula de iARN es una molécula de dsARN. En estas modalidades y en otras, la o las moléculas de ácido nucleico comprenden moléculas de dsARN cada una de las cuales comprende más de un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros. En algunos ejemplos, la o las moléculas de ácido nucleico consisten en un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plagas de coleópteros.

En algunas modalidades, se provee un método para incrementar el rendimiento de una planta de cultivo, en el que el método comprende introducir en una plaga de coleópteros hembra (por ejemplo, por inyección, por ingesta, por atomización, y mediante expresión a partir de un ADN) por lo menos una molécula de ácido nucleico de la invención; y liberar la plaga hembra en el cultivo, en donde las parejas de apareamiento que incluyen la plaga hembra son incapaces de producir una descendencia viable, o tienen una menor capacidad para hacerlo, con lo que se reduce o elimina una pérdida de rendimiento debido a la infestación de la plaga de coleópteros. En modalidades particulares, un método de este tipo provee un control sobre las generaciones subsiguientes de la plaga. En modalidades similares, el método comprende introducir la molécula de ácido nucleico de la invención en una plaga de coleópteros macho, y

liberar el coleóptero macho en el cultivo (por ejemplo, en donde las plagas macho con pARNi producen menos esperma que los controles que no han sido tratados). Por ejemplo, dado que típicamente las WCR hembra se aparean una sola vez, estos machos y hembras con pARNi pueden utilizarse en competencia de manera de superar los insectos WCR nativos en la búsqueda de compañeros de apareamiento. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN que se expresa de manera de producir una molécula de iARN. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico es una molécula de dsARN. En estas modalidades y en otras, la o las moléculas de ácido nucleico comprenden moléculas de dsARN cada una de las cuales comprende más de un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros. En algunas modalidades, la o las moléculas de ácido nucleico consisten en un polinucleótido que puede hibridar específicamente a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros.

En algunas modalidades, se provee un método para modular la expresión de un gen diana en una plaga de coleópteros, que comprende: transformar una célula de planta con un vector que comprende un polinucleótido que codifique por lo menos una molécula de iARN de la invención, en donde el polinucleótido está operativamente ligado a un promotor y a un elemento de terminación de la transcripción; cultivar la célula de la planta transformada en

condiciones que son suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo de células de planta que incluye una pluralidad de células de plantas transformadas; seleccionar las células de planta transformadas que tengan integrado el polinucleótido en sus
5 genomas; clasificar las células de plantas transformadas en base a la expresión de una molécula de iARN codificada por el polinucleótido integrado; seleccionar una célula de planta transgénica que exprese la molécula de iARN; y alimentar el coleóptero de plaga con la célula de planta transgénica
10 seleccionada. También es posible regenerar plantas a partir de células de planta transformadas que expresan una molécula de iARN codificada por la molécula de ácido nucleico integrada. En algunas modalidades, la molécula de iARN es una molécula de dsARN. En estas modalidades y en otras, la o las moléculas de ácido nucleico
15 comprenden moléculas de dsARN cada una de las cuales comprende más de un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros. En algunas modalidades, la o las moléculas de ácido nucleico consisten en un polinucleótido que es específicamente
20 hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros.

Las moléculas de iARN de la invención pueden ser incorporadas en las semillas de especies de plantas (por ejemplo, maíz), sea como un producto de expresión de un gen recombinante
25 incorporado en un genoma de la célula de plantas, o incorporado en

un recubrimiento o tratamiento de las semillas que es aplicado a las semillas antes de su plantación. Una célula de planta que comprende un gen recombinante se considera como un evento transgénico. En algunas modalidades de la invención también se incluyen sistemas de entrega para la entrega de moléculas de iARN a la plaga de coleópteros. Por ejemplo, las moléculas de iARN de la invención pueden ser introducidas directamente en las células de una o más plagas. Los métodos para la incorporación pueden incluir el mezclado directo de iARN a la dieta de la plaga de coleópteros (por ejemplo al mezclar con tejido de planta de un anfitrión), como también la aplicación de composiciones que comprenden moléculas de iARN de la invención al tejido de la planta anfitrión. Por ejemplo, las moléculas de iARN pueden ser sembradas sobre la superficie de la planta. Como alternativa, una molécula de iARN puede ser expresada por un microorganismo, y el microorganismo puede ser aplicado sobre la superficie de la planta, o ser introducido en una raíz o tallo mediante un medio físico tal como una inyección. Como se expuso con anterioridad, también es posible diseñar genéticamente una planta transgénica para que exprese por lo menos una molécula de iARN en una cantidad suficiente para matar la plaga de coleópteros que se sabe que infesta la planta. Las moléculas de iARN producidas mediante síntesis química o enzimática también pueden formularse de una manera compatible con las prácticas comunes en agricultura, y también se las puede utilizar como productos pulverizables para controlar el daño infligido

por una plaga de coleópteros a las plantas. Las formulaciones pueden incluir los adyuvantes adecuados (por ejemplo, agentes de pegajosidad y humectantes) requeridos para un recubrimiento foliar suficiente, como también los protectores contra la UV para proteger las moléculas de iARN (por ejemplo, las moléculas de dsARN) contra el daño infligido por la radiación ultravioleta. Tales aditivos son de uso común en la industria de los bioinsecticidas, y son bien conocidos para los expertos en la técnica. Tales aplicaciones puede combinarse con otras aplicaciones para el rociado de insecticidas (de base biológica u otra), destinadas a reforzar la protección de las plantas contra la plaga de coleópteros.

Todas las referencias, lo que incluye las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes, mencionadas en la presente se incorporan en la presente en la medida en que no son incompatibles con los detalles explícitos de esta divulgación, y por lo tanto se las incorpora con la misma amplitud como si cada referencia estuviese individual y específicamente indicada a ser incorporada como referencia y tal como se establece en la presente. Las referencias expuestas en la presente se proveen solamente a los fines de su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo que se indique en la presente debe interpretarse como una admisión que los inventores no tienen derecho a antedatar dicha divulgación en virtud de invención anterior.

Se proveen los siguientes ejemplos a efectos de ilustrar

determinados rasgos y/o aspectos particulares. Estos ejemplos no deben interpretarse como límites de la divulgación a los rasgos o aspectos descritos.

Ejemplos

5 Ejemplo 1: Materiales y métodos

Preparación de muestras y bioensayos de alimentación de larvas de *Diabrotica*.

Una cantidad de moléculas de dsARN (lo que incluye las correspondientes a *hunchback*) fueron sintetizadas y purificadas mediante un kit MEGASCRIP[®]T[®] ARNi (LIFE TECHNOLOGIES) o el kit HiScribe[®] In Vitro Transcription. Las moléculas de dsARN purificadas fueron preparadas en tampón TE, y todos los ensayos biológicos contenían un tratamiento de control consistente en este tampón, que sirvió como verificación de fondo para establecer la mortalidad o inhibición del crecimiento de WCR. Las concentraciones de las moléculas de dsARN en el tampón de bioensayo fueron medidas mediante un espectrofotómetro NANODROP[™] 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE).

Las muestras fueron sometidas a ensayo para establecer la actividad de los insectos en ensayos biológicos llevados a cabo con larvas de insectos neonatos en una dieta artificial para insectos. Los huevos de WCR fueron provistos por CROP CHARACTERISTICS, INC. (Farmington, MN).

Los bioensayos fueron llevados a cabo en bandejas de material plástico de 128 cavidades diseñadas específicamente para ensayos

biológicos con insectos (C-D INTERNATIONAL, Pitman, NJ). Cada cavidad contenía aproximadamente 1.0 ml de una dieta diseñada para el crecimiento de insectos coleóptero. Se entregó una alícuota de 60 μ l de muestra de dsARN mediante pipeta sobre la superficie de 1.5 cm^2 de la dieta de cada cavidad (40 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). Se calcularon las concentraciones de las muestras de dsARN como la cantidad de dsARN por centímetro cuadrado (ng/cm^2) de área superficial en la cavidad. Las bandejas tratadas fueron mantenidas en una campana de humos hasta que el líquido presente sobre superficie de la dieta se hubo evaporado o fue absorbido en la dieta.

A las pocas horas después de la explosión, las larvas individuales fueron recogidas mediante un cepillo de cabellos de camello humedecido y se las depositó sobre la dieta tratada (a razón de dos larvas por cavidad). Las cavidades infestadas de las bandejas de material plástico de 128 cavidades fueron seguidamente selladas con láminas adhesivas de material plástico transparente, y se las venteó para permitir el intercambio de gases. Las bandejas de ensayo biológico fueron mantenidas en condiciones ambientales controladas (28°C, ~40% de humedad relativa, 16:8 (luz: oscuridad) durante nueve días, después de lo cual se registró el número total de insectos dispuestos a cada muestra, la cantidad de insectos muertos, y el peso de los insectos sobrevivientes. La mortalidad porcentual, los pesos medios promedios, y la inhibición del crecimiento fueron calculados para cada tratamiento. El deterioro fue definido como una disminución en los pesos vivos promedios. La inhibición del

crecimiento (GI, por sus siglas en inglés) se calculó como sigue:

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

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

5 TNIT es el número total de insectos en el tratamiento;

TWIBC es el peso total de insectos vivos en la verificación de fondo (tampón de control); y

TNIBC es el número total de insectos en la verificación de fondo (tampón de control).

10 El GI_{50} se determina como la concentración de muestra en la dieta en la que el valor del GI es del 50%. Se registra el LC_{50} (concentración letal correspondiente al 50%) como la concentración de muestra en la dieta a la que muere el 50% de los insectos del ensayo. El análisis estadístico se efectuó utilizando el software
15 JMP™ e (SAS, Cary, NC).

Ejemplo 2: Identificación de genes diana candidato de *Diabrotica*

Se seleccionaron múltiples etapas del desarrollo de WCR (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) para el análisis unificado de transcriptomas a efectos de proveer secuencias de genes diana
20 candidato para el control mediante la tecnología basada en ARNi para establecer la protección de las plantas transgénicas contra los insectos.

En una ejemplificación, se aisló ARN total de aproximadamente 0.9 gm de larvas de WCR enteras en su primera etapa de
25 metamorfosis (de 4 a 5 días después de la explosión; mantenidas a

16°C), y se purificó utilizando el siguiente método basado en fenol/TRI REAGENT® (MOLECULAR RESEARCH CENTER, Cincinnati, OH).

Las larvas fueron homogeneizadas a temperatura ambiente en un homogeneizador de 15 ml con 10 ml de TRI REAGENT® hasta que se obtuvo una suspensión homogénea. Después de cinco minutos de incubación a temperatura ambiente, el material homogeneizado fue dispensado en tubos de microcentrifugación de 1.5 ml (1 ml por tubo), se añadieron 200 µl de cloroformo, y la mezcla fue sometida a una agitación vigorosa durante 15 segundos. Después de permitir que la extracción se asentase a temperatura ambiente durante 10 minutos, las fases fueron separadas mediante centrifugación a 12,000 x g a 4°C. La fase superior (que comprendía aproximadamente 0.6 ml) fue cuidadosamente transferida a otro tubo estéril de 1.5 ml, y se añadió un volumen igual de isopropanol a temperatura ambiente. Después de la incubación a temperatura ambiente durante de 5 a 10 minutos, la mezcla fue centrifugada durante 8 minutos a 12,000 x g (4°C o 25°C).

El material sobrenadante fue cuidadosamente removido y descartado, y las pellas de ARN fueron lavadas dos veces por vórtice con etanol al 75%, recuperándose por centrifugación durante 5 minutos a 7,500 x g (4°C o 25°C) después de cada lavado. El etanol fue cuidadosamente removido, las pellas fueron dejadas secarse al aire durante de 3 a 5 minutos, y seguidamente se disolvió en agua estéril libre de nucleasa. La concentración de ARN se determinó

midiendo la absorción (A) a 260 nm y a 280 nm. Una extracción típica de aproximadamente 0.9 gm de larvas permitió obtener más de un 1 mg de ARN total, con una relación A260/A280 de 1,9. El ARN así extraído fue guardado a una temperatura de -80°C hasta su procesamiento ulterior.

Se determinó la calidad del ARN haciendo pasar una alícuota de gel de agarosa al 1%. La solución de gel de agarosa fue preparada utilizando tampón 10x TAE en autoclave (Tris-acetato EDTA; 1x concentración es 0,04 M Tris-acetato, 1 mM EDTA (sal sódica de ácido etilendiamintetra-acético), pH 8.0) diluido con agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato) en un contenedor bajo autoclave. Se utilizó 1x TAE como tampón de flujo. Antes del uso, el tanque de electroforesis y el peine formador de cavidades fueron limpiados con ARNseAway™ (INVITROGEN INC., Carlsbad, CA). Dos µl de muestra de ARN fueron mezclados con 8 µl de tampón TE (10 mM Tris HCl pH 7.0; 1 mM EDTA) y 10 µl de tampón muestra de ARN (NOVAGEN® Catalog No 70606; EMD4 Bioscience, Gibbstown, NJ). La muestra fue calentada a 70°C durante 3 min, enfriada a temperatura ambiente, y 5 µl (que contenían 1 o 2 µg de ARN) fueron cargados por cavidad. Simultáneamente se hicieron pasar marcadores de peso molecular de ARN disponibles en el comercio en cavidades separadas, a efecto de comparar los tamaños moleculares. Se hizo pasar el gel a 60 voltios durante 2 horas.

Se preparó una biblioteca de ADN normalizada a partir del ARN total de larva mediante un proveedor comercial de servicios

(EUROFINS MWG Operon, Huntsville, AL), utilizándose un cebado aleatorio. La biblioteca de cADN larval fue secuenciada a una escala de media placa mediante la química seriada GS FLX 454 Titanium™ en EUROFINS MWG Operon, resultando más de 600.000 lecturas con una longitud de lectura promedia de 348 bp. Se ensamblaron 350.000 lecturas en más de 50,000 cóntigos. Tanto las lecturas no ensambladas como los cóntigos fueron convertidos en bases de datos BLASTable utilizándose el programa públicamente disponible FORMATDB (provisto por NCBI).

De manera similar se prepararon bibliotecas de ARN total y de cADN normalizado a partir de materiales cosechados en otras etapas de desarrollo del WCR. Se construyó una biblioteca unificada de transcriptomas para la selección de gen diana mediante la combinación de miembros de la biblioteca de cADN representativos de las diversas etapas del desarrollo.

Se seleccionaron genes candidato para el apuntamiento a ARNi utilizando información relacionada con los efectos letales del ARNi de genes particulares en otros insectos tales como *Drosophila* y *Tribolium*. Por ejemplo, el gen de huelgo *hunchback*, un factor de transcripción necesario para el establecimiento de la polaridad anterior-posterior durante el desarrollo embrionario temprano, fue seleccionado sobre la conservación global de la función *hunchback* en *Drosophila* and *Tribolium* (Brizuela *et al.* (1994) Genetics 137(3):803-13; Schroder (2003) Nature 422(6932):621-5; Marques-Souza *et al.* (2008) Development 135(5):881-8).

Las búsquedas en TBLASTN mediante secuencias codificadoras de proteínas candidato fueron efectuadas con respecto a bases de datos de BLASTable que contenían las lecturas de secuencia de *Diabrotica* no ensambladas o los cóntigos ensamblados. Las concordancias significativas con respecto a una secuencia de *Diabrotica* (mejor definido como e^{-20} para homologías de cóntigos y mejor que e^{-10} para las homologías de lecturas de secuencias no ensambladas) fueron confirmadas utilizando BLASTX en comparación con la base de datos no redundante de NCBI. Los resultados de esta búsqueda por BLASTX confirmaron que la secuencias candidato homólogas del homólogo de *Diabrotica* identificadas en la búsqueda por TBLASTN de hecho comprendían genes de *Diabrotica*, o fueron la mejor concordancia con respecto a la secuencia de genes candidato no *Diabrotica* presentes en las secuencias de *Diabrotica*. En la mayoría de los casos, los genes candidatos de *Tribolium* que fueron anotados como codificadores de proteína dieron como resultado una homología de secuencias no ambigua con respecto a una o más secuencias en el transcriptoma de *Diabroticas*. En unos pocos casos, era evidente que algunas de las lecturas de secuencia o cóntigos de *Diabrotica* o no ensambladas seleccionadas por homología con un gen candidato no *Diabrotica* se superponían, y que el conjunto de los cóntigos no había podido unir estas superposiciones. En estos casos, se utilizó el Sequencher™ v4.9 (GENE CODES CORPORATION, Ann Arbor, MI) para ensamblar las secuencias en cóntigos más largos.

Se ha descrito anteriormente la secuenciación de transcriptoma adicional de *D. v. virgifera*. Eyun *et al.* (2014) PLoS One 9(4):e94052. En otra ejemplificación, utilizándose tecnologías de secuenciación Illumina™ paired-end como también de 454 Titanium, se secuenció un total de ~700 gigabases a partir de ADN preparado a partir de huevos (15.162.017 lecturas Illumina™ paired-end después de filtrado), neonatos (721,697,288 lecturas Illumina™ paired-end después de filtrado), y de intestino de larvas en tercera etapa de metamorfosis (44.852.488 lecturas Illumina™ paired-end y 415,742 lecturas Roche 454, ambas después de filtrado). El ensamble de transcriptoma *de novo* se llevó a cabo utilizando Trinity (Grabherr *et al.* (2011) Nat. Biotechnol. 29(7):644-52) para cada una de las tres muestras como también para el conjunto de datos unificado. El ensamble unificado resultó en 163,871 cóntigos con una longitud promedia de 914 bp. Las secuencias de aminoácidos de HUNCHBACK de *Drosophila* o *Tribolium* fueron utilizadas como secuencias de consulta para investigar en el transcriptoma de gusano de las raíces y en la base de datos de genoma (no publicado) con tBLASTN utilizándose un valor de corte E igual a 10^{-5} . Las secuencias de aminoácidos deducidas fueron alineadas con ClustalX™ y editadas con software GeneDoc™.

Se identificó un gen diana candidato que puede conducir a una mortalidad de la plaga de coleópteros o a la inhibición del crecimiento, desarrollo, o reproducción en WCR, incluyendo el transcripto SEC ID NO:1, con subsecuencias SEC ID NO:3 y SEC ID

NO:67. Estas secuencias codifican una proteína HUNCHBACK o subregiones de ésta, que corresponden a un factor de transcripción de la familia de las proteínas de dedos de cinc de tipo C2H2 que también se define como un gen de huelgo, una pérdida génica del mismo produce un huelgo en el plano del cuerpo. Dentro de la
 5 secuencia *hunchback* del WCR *hunchback*, se predijeron seis dominios de dedos de cinc de tipo C2H2 utilizando la base de datos SMART (disponible en internet en InterProScan) en las posiciones 226-248, 255-277, 283-305, 311-335, 520-542, y 548-572 de la
 10 proteína de 573 aminoácidos, de acuerdo con su rol como factor de transcripción de dedos de cinc. Figura 2.

El polinucleótido de la SEC ID NO:1 es novedoso. Esta secuencia no ha sido provista en bases de datos públicas y no ha sido divulgada en el documento WO/2011/025860; Solicitud de
 15 patente de Estados Unidos No. 20070124836; Solicitud de patente de Estados Unidos No. 20090306189; Solicitud de patente de Estados Unidos No. US20070050860; Solicitud de patente de Estados Unidos No. 20100192265; o patente de Estados Unidos No. 7,612,194. No se encontró una secuencia de nucleótidos homóloga significativa en una
 20 búsqueda en GENBANK. El homologo más cercano a la secuencia de aminoácidos de *Diabrotica* HUNCHSACK (SEC ID NO:2) es una proteína de *Tribolium castaneum* que tiene el número de acceso a GENBANK NP_001038093.1 (66% similar; 53% idéntico por sobre el régimen de homología).

25 Se utilizaron clones de longitud completa o parciales de

secuencias del gen candidato *hunchback* de *Diabrotica*, para generar amplicones de PCR para la síntesis de dsARN. El dsARN también fue utilizado para generar amplicones de PCR para la síntesis de dsARN. El dsARN también fue ampliado a partir de un clon de ADN que comprendía la región de codificación para una proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEC ID NO:10; Shagin *et al.* (2004) Mol. Biol. Evol. 21:841-850).

Ejemplo 3: Amplificación de genes diana de *Diabrotica*

Se diseñaron cebadores para ampliar porciones de regiones de codificación de cada gen diana por PCR. Ver la Tabla 1. Cuando era adecuado, una secuencia promotora de fago T7 fue incorporada en los extremos 5' de las cadenas de sentido o de antisentido ampliadas. Véase la Tabla 1. Se extrajo el ARN total de WCR, y se utilizó el cADN de primera cadena como plantilla para las reacciones de PCR utilizándose cebadores opuestos posicionados de manera de ampliar la totalidad o parte de la secuencia génica diana nativa.

Tabla 1. Cebadores y pares de cebadores utilizados para amplificar porciones de regiones codificadoras de ejemplos de genes diana *hunchback* e YPF.

	Gen (Región)	ID del cebador	Secuencia
Par 1	<i>hunchback</i> Reg1	<i>hunchback</i> _T7F	TAATACGACTCACTATAGGGAAGTGTAAGCAATGTGATT (SEC ID NO:5)
		<i>hunchback</i> _T7R	TAATACGACTCACTATAGGGCCTCTCCTTGTACCATAA (SEC ID NO:6)
Par 2	<i>hunchback</i> v1	<i>hunchback</i> v1_F	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACAATACCGCTGTTCTGACTGC (SEC ID NO:68)
		<i>hunchback</i> v1_R	TTAATACGACTCACTATAGGGAGATCCTCTCCTTGTACCATAAACATC (SEC ID NO:69)

	Gen (Región)	ID del cebador	Secuencia
5	Par 3 <i>YFP</i>	YFP-F_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACACCATGGGCTCCAGCGGCGCCC (SEC ID NO:41)
		YFP-R_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGATCTTGAAGGCGCTCTCAGG (SEC ID NO:44)
	Par 4 <i>GFP</i>	GFP-F_T7	TAATACGACTCACTATAGGGGGTGATGCTACATACGGAAAG (SEC ID NO:7)
		GFP-R_T7	TAATACGACTCACTATAGGGTTGTTTGTCTCCGTGAT (SEC ID NO:8)

Ejemplo 4: Constructos de ARNi

10 Preparación de plantillas mediante PCR y síntesis de dsARN.

Las estrategias utilizadas para la provisión de plantillas específicas para la producción de dsARN *hunchback* se muestran en las Figuras 1A y 1B. Los ADN de plantilla previstos para ser utilizados en la síntesis de dsARN de *hunchback* Reg 1 o de *hunchback* v1 fueron preparados mediante PCR utilizándose los Pares de Cebadores 1 y 2 respectivamente (Tabla 1) y (como plantilla de PCR) cADN de primera cadena preparada a partir de ARN total. Para las regiones de gen diana seleccionadas *hunchback* Reg 1 y *hunchback* v1, se llevaron a cabo dos amplificaciones de PCR por separado. Figura 1. La primera amplificación de PCR introduce una secuencia promotora T7 en los extremos 5' de las cadenas de sentido ampliadas. La segunda reacción incorporó la secuencia promotora T7 en los extremos 5' de las cadenas antisentido. Los dos fragmentos amplificados por PCR para cada región de los genes diana fueron seguidamente mezclados en cantidades

aproximadamente iguales, y se utilizó la mezcla como una plantilla de transcripción para la producción de dsARN. Figura 1. La secuencia de la plantilla dsARN de *hunchback* Reg1 amplificada con los cebadores particulares ha sido divulgada en la secuencia SEC ID NO:3. La secuencia de la plantilla de dsARN de *hunchback* v1
 5 amplificada con los cebadores particulares, se divulga como SEC ID NO:67.

Para el control negativo de YPF, se llevó a cabo una única amplificación por PCR. Figura 1B. La amplificación por PCR introdujo
 10 una secuencia promotora T7 en los extremos 5' de las cadenas de sentido y de antisentido amplificadas. Los dos fragmentos amplificados por PCR para cada región de los genes diana fueron seguidamente mezclados en cantidades aproximadamente iguales, y se utilizó la mezcla como una plantilla de transcripción para la
 15 producción de dsARN. Figura 1B. El dsARN para la región codificadora YPF de control negativo (SEC ID NO:10) se produjo utilizando el Par de Cebadores 3 (Tabla 1) y un clon de ADN de la región codificadora de YFP como plantilla. Un control negativo de GFP fue ampliado a partir del vector de expresión pIZT/V5-His
 20 (Invitrogen) para lo cual se utilizó el Par de Cebadores (Tabla 1). El producto de PCR amplificado para *hunchback* y GFP fue utilizado como una plantilla para la síntesis *in vitro* de dsARN para lo cual se utilizó el kit de transcripción de elevado rendimiento MEGAscript (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Los dsARN sintetizados
 25 fueron purificados mediante el kit RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia,

CA) o mediante un kit AMBION® MEGAscript® ARNi, siguiéndose esencialmente las instrucciones del fabricante. Los preparados de dsARN fueron cuantificados mediante un espectrofotómetro ANODROP™ 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE) o medios equivalentes, y se analizó mediante electroforesis en gel a efectos de determinar la pureza.

Ejemplo 5: Selección de genes diana candidato en larvas de *Diabrotica*

Los ensayos biológicos replicados demostraron que la ingesta de preparados de dsARN sintéticos derivados de la secuencia de genes diana *hunchback* Reg 1 identificados en el Ejemplo 2 causaron mortalidad e inhibición del crecimiento de larvas occidentales de las raíces del maíz cuando fue administrado a WCR en ensayos basados en dieta. Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de ensayos biológicos basados en dieta, de larvas de WCR después de una exposición de 9 días a una única dosis de dsARN. El análisis ANOVA mostró algunas diferencias significativas en la Mortalidad Porcentual Media (Mort.) y en la Inhibición Media del Crecimiento (GI). Los medios fueron separados utilizando el test de Tukey-Kramer.

Nombre de la muestra	Dosis (ng/cm ²)	N.º de filas (replicaciones)	*Media/ % de mortalidad +/- SEM	*GI media +/- SEM
<i>hunchback</i> Reg 1	500	6	52.94±16.36 (A)	0.68±0.17 (A)
<i>hunchback</i> v 1	500	8	9.85±2.37 (B)	-0.11±0.19 (B)

Nombre de la muestra	Dosis (ng/cm ²)	N.º de filas (replicaciones)	*Media/ % de mortalidad +/- SEM	*GI media +/- SEM
Tampón TE**	0	8	11.76±4.58 (B)	0.05±0.04 (B)
Agua	0	8	10.29± 3.09 (B)	0.05±0.04 (B)
YFP dsARN***	500	8	9.65±3.31 (B)	0.12±0.07 (B)

5

*SEM- Error Estándar de la Media. Las letras entre paréntesis designan niveles estadísticos. Los niveles no conectados por la misma letra difieren significativamente entre sí ($p < 0.05$).

**TE- Tris HCl (1 mM) más tampón EDTA (1 mM), pH7.2.

10

***YFP- Proteína Fluorescente Amarilla

15

Se ha sugerido anteriormente que determinados genes de *Diabrotica* spp. pueden ser utilizados para el control mediado por ARNi, de insectos. Véase la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 2007/0124836, que divulga 906 secuencias, y la patente de Estados Unidos 7,614,924, que divulga 9,112 secuencias. Sin embargo, se determinó que muchos genes sugeridos como útiles para el control de los insectos, mediado por ARNi, no son eficaces para controlar *Diabrotica*. También se determinó que *hunchback* Reg1 proveyó un control sorprendente e imprevisto de *Diabrotica*, en comparación con otros genes de los que se sugirió que son útiles para control mediado por ARNi, de los insectos.

20

25

Por ejemplo, se ha sugerido en la patente de Estados Unidos 7,614,924 que cada uno de los siguientes: Annexina, Beta Espectrina 2, y mtRP-L4 son eficaces en el control mediado de los insectos. La SEC ID NO:11 es la secuencia de ADN de la Annexina Región 1 y la SEC ID

NO:12 es la secuencia de ADN de la Annexina Región 2. La SEC ID NO:13 es la secuencia de ADN de la Beta Espectrina 2 Región 1 y la SEC ID NO:14 es la secuencia de ADN de la Beta Espectrina 2 Región 2. La SEC ID NO:15 es la secuencia de ADN de la mtRP-L4 Región 1 y la SEC ID NO:16 es la secuencia de ADN de la mtRP-L4 Región 2.

Cada uno de los métodos anteriormente mencionados fue utilizado para producir dsARN mediante los métodos de los pares de cebadores del EJEMPLO 4 (Figuras 4A-4B), y los dsARN fueron sometidos a ensayo, cada uno de ellos, mediante los métodos de ensayo biológico basados en dieta anteriormente descritos. También se utilizó una secuencia de YPF (SEC ID NO:10) para producir dsARN como control negativo. En la Tabla 3 se enumeran las secuencias de los cebadores utilizados para producir las moléculas de Annexina, Beta Espectrina 2, mtRP-L4, y YFP dsARN. En la Tabla 4 se presentan los resultados de los ensayos biológicos de alimentación basados en dieta de larvas WCR después de una exposición de 9 días a estas moléculas de dsARN. Los ensayos biológicos replicados demostraron que la ingesta de estos dsARN no resultaron en ninguna mortalidad ni inhibición del crecimiento de las larvas de los gusanos occidentales de las raíces del maíz superior a la observada en las muestras de control de tampón TE, YFP dsARN, o agua.

Tabla 3. Cebadores y pares de cebadores utilizados para amplificar porciones de regiones de codificación de genes.

	Región del gen	ID del cebador	Secuencia
5	Annexina Región 1	Ann-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTCCAACAGTGGT TCCTTATC (SEC ID NO:17)
	Annexina Región 1	Ann-R1	CTAATAATTCTTTTTTAATGTTCTCTGAGG (SEC ID NO:18)
	Annexina Región 1	Ann-F1	GCTCCAACAGTGGTTCCTTATC (SEC ID NO:19)
	Annexina Región 1	Ann-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTAATAATTCTTTT TTAATGTTCTCTGAGG (SEC ID NO:20)
10	Annexina Región 2	Ann-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGATTGTTACAAGCTGG AGAACTTCTC (SEC ID NO:21)
	Annexina Región 2	Ann-R2	CTTAACCAACAACGGCTAATAAGG (SEC ID NO:22)
	Annexina Región 2	Ann-F2	TTGTTACAAGCTGGAGAACTTCTC (SEC ID NO:23)
	Annexina Región 2	Ann-R2T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTTAACCAACAACG GCTAATAAGG (SEC ID NO:24)
15	Beta-Spect2 Región 1	Betasp2-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGATGTTGGCTGCA TCTAGAGAA (SEC ID NO:25)
	Beta-Spect2 Región 1	Betasp2-R1	GTCCATTTCGTCCATCCACTGCA (SEC ID NO:26)
	Beta-Spect2 Región 1	Betasp2-F1	AGATGTTGGCTGCATCTAGAGAA (SEC ID NO:27)
	Beta-Spect2 Región 1	Betasp2-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCCATTCGTCCAT CCACTGCA (SEC ID NO:28)
20	Beta-Spect2 Región 2	Betasp2-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAGATGAACACCA GCGAGAAA (SEC ID NO:29)
	Beta-Spect2 Región 2	Betasp2-R2	CTGGGCAGCTTCTTGTTTCCTC (SEC ID NO:30)
	Beta-Spect2 Región 2	Betasp2-F2	GCAGATGAACACCAGCGAGAAA (SEC ID NO:31)
	Beta-Spect2 Región 2	Betasp2-R2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGGGCAGCTTCTT GTTTCCTC (SEC ID NO:32)
25	mtRP-L4 Región 1	L4-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTGAAATGTTAGC AAATATAACATCC (SEC ID NO:33)

	Región del gen	ID del cebador	Secuencia
	mtRP-L4 Región 1	L4-R1	ACCTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG (SEC ID NO:34)
5	Par 14	mtRP-L4 Región 1	L4-F1 AGTGAAATGTTAGCAAATATAACATCC (SEC ID NO:35)
		mtRP-L4 Región 1	L4-R1_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGAACCTCTCACTTCAA ATCTTGACTTTG (SEC ID NO:36)
	Par 15	mtRP-L4 Región 2	L4-F2_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAGTCAAGATTT GAAGTGAGAGGT (SEC ID NO:37)
		mtRP-L4 Región 2	L4-R2 CTACAAATAAAACAAGAAGGACCCC (SEC ID NO:38)
10	Par 16	mtRP-L4 Región 2	L4-F2 CAAAGTCAAGATTTGAAGTGAGAGGT (SEC ID NO:39)
		mtRP-L4 Región 2	L4-R2_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTACAAATAAAACA AGAAGGACCCC (SEC ID NO:40)
	Par 17	YFP	YFP-F_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGACACCATGGGCTCCA GCGGCGCCC (SEC ID NO:41)
		YFP	YFP-R AGATCTTGAAGGCGCTCTTCAGG (SEC ID NO:42)
15	Par 18	YFP	YFP-F CACCATGGGCTCCAGCGGCGCCC (SEC ID NO:43)
		YFP	YFP-R_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGATCTTGAAGGCG CTCTTCAGG (SEC ID NO:44)

Tabla 4. Resultados de los ensayos de alimentación con dieta obtenidas con larvas de gusano occidental de las raíces del maíz.

	Nombre del gen	Dosis (ng/cm²)	Peso medio por insecto (mg)	Mortalidad media %	Inhibición media del crecimiento
20	annexina-región 1	1000	0.545	0	-0.262
	annexina-región 2	1000	0.565	0	-0.301
	beta spectrin2 región 1	1000	0.340	12	-0.014
	beta spectrin2 región 2	1000	0.465	18	-0.367
25	mtRP-L4 región 1	1000	0.305	4	-0.168

Nombre del gen	Dosis (ng/cm ²)	Peso medio por insecto (mg)	Mortalidad media %	Inhibición media del crecimiento
mtRP-L4 región 2	1000	0.305	7	-0.180
Tampón TE	0	0.430	13	0.000
Agua	0	0.535	12	0.000
YFP	1000	0.480	9	-0.386

5

Ejemplo 6: Preparación de muestras y bioensayos para ensayos de alimentación de *Diabrotica* adultos

La interferencia de ARN parental (ARNi) en gusanos occidentales de las raíces del maíz fue llevado a cabo alimentando con dsARN correspondiente a los segmentos de secuencia de gen diana *hunchback* a hembras adultas preñadas. Se obtuvieron gusanos de las raíces adultos (<48 horas después de emergencia) provistos por CROP CHARACTERISTICS, Inc. (Farmington, MN). Los adultos fueron criados a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, bajo una humedad relativa superior al 75% y con períodos de luz/oscuridad de 8:16 horas para todos los bioensayos. La dieta para la cría de los insectos fue adaptada a partir de la indicado por Branson y Jackson (1988), J. Kansas Entomol. Soc. 61:353-55. Se añadieron ingredientes secos (48 gm/100 ml) a una solución que contenía agua doblemente destilada con 2,9% de agar y 5,6 ml de glicerol. Adicionalmente, 0.5 ml de una mezcla que comprendía soluciones de ácido propiónico al 47% y ácido fosfórico al 6% por cada 100 ml de dieta a efecto de inhibir el crecimiento microbiano. El agar fue disuelto en agua en ebullición y los ingredientes secos, el glicerol, y la solución de ácido propiónico/ácido fosfórico fueron añadidos, mezclados

10

15

20

25

intensivamente, y vertidos a una profundidad de aproximadamente 2 mm. Unos tarugos de dieta solidificados (aproximadamente 4 mm de diámetro y 2 mm de altura; 25,12 mm³) fueron recortados de la dieta mediante un taladro para corcho No. 1. Seis machos y hembras
 5 adultos (de 24 a 48 horas de edad) fueron mantenidos en base a una dieta artificial no tratada y se les permitió aparearse durante cuatro días en 16 bandejas de cavidades (de 5,1 cm de longitud x 3,8 cm de ancho y 2,9 cm de altura) con tapas ventiladas.

En el día cinco, los machos fueron retirados del contenedor, y
 10 las hembras fueron alimentadas con tarugos de superficie de dieta artificial tratados con μ l de *hunchback* Reg1 (SEC ID NO:3) dsARN específico para gen (2 μ g/tampón de dieta; aproximadamente 79.6 ng/mm³). Los tratamientos del control consistieron en hembras preñadas expuestas a la dieta tratada con la misma concentración de
 15 GFP dsARN (SEC ID NO:9) o al mismo volumen de agua. El GFP dsARN fue producido como se describió anteriormente o poniendo cebadores que tienen una secuencia promotora T7 en sus extremos 5' (SEC ID NO:7 y 8). Se proveyó dieta artificial fresca tratada con dsARN cada dos días a lo largo del experimento. En el día 11, las
 20 hembras fueron transferidas a jaulas de oviposición (de 7.5 cm x 5.5 cm x 5.5 cm) (ShowMan box, Althor Products, Wilton, CT) que contenían suelo limoso de arcilla sometido a autoclave que había sido cribado a través de una criba de malla 60 (Jackson (1986) Rearing and handling of *Diabrotica* virgifera and *Diabrotica*
 25 undecimpunctata howardi. Páginas 25 a 47 en J. L. Krysan y T.A.

Miller, eds. Methods for the study of pest *Diabrotica*. Springer-Verlag, New York). Se permitió a las hembras depositar huevos durante cuatro días y los huevos fueron incubados en suelo dentro de las cajas de oviposición durante 10 días a 27°C y seguidamente se los removio del suelo mediante lavado del suelo de oviposición a través de una criba de malla 60. Los huevos fueron tratados con una solución de formaldehído (500 µl de formaldehido en 5 ml de agua doblemente destinada) y metil-(buticarbamoi)-2-bencimidazol carbamato (0.025 g en 50 ml de agua doblemente destinada) de manera de prevenir el crecimiento de hongos. Las hembras fueron retiradas de las cajas de oviposición y las submuestras de huevos de cada tratamiento fueron congeladas instantáneamente en nitrógeno líquido para subsiguiente análisis de expresión mediante RT-PCR cuantitativo (de ver el EJEMPLO 7). Los platos fueron fotografiados mediante el microscopio digital Dino-Lite Pro (Torrance, CA) y se contó la totalidad de huevos utilizando la función contadora de células del software de Image J (Schneider *et al.* (2012) Nat. Methods 9:671-5). Los huevos cosechados fueron mantenidos en platos de Petri sobre papel fieltro humedecido a 28°C y se supervisó durante 15 días a efectos de determinar la viabilidad de los huevos. Se hicieron seis pasadas, cada una de las cuales comprendía de tres a seis hembras, en días separados. La cantidad de larvas eclosionadas de cada tratamiento fue registrada hasta que ya no se observaron más eclosiones.

Se comprobó que la ingesta de moléculas de *hunchback* Reg1

dsARN por las hembras de WCR adultas tenía un efecto sorprendente, drástico y reproducible sobre la viabilidad de los huevos. Las hembras apareadas expuestas a la *hunchback* dsARN produjeron una cantidad aproximadamente igual de huevos que las hembras que habían sido expuestas a una dieta sin tratar o a una dieta tratada con GFP dsARN (Figura 3A; Tabla 5). Sin embargo, los huevos recolectados de hembras que habían sido expuestas a *hunchback* dsARN no eran viables (Figura 3B; Tabla 5). Menos del 3% de los huevos puestos por las hembras que habían sido expuestas a *hunchback* dsARN eclosionaron.

Las Figuras 3A y 3B resumen gráficamente los datos de la Tabla 5 en cuanto a los efectos que los tratamientos con dsARN tuvieron sobre la producción de huevos y sobre la viabilidad de los huevos.

Tabla 5. Efecto de *hunchback* dsARN sobre la producción de huevos de WCR y sobre la viabilidad de los huevos después de 11 días de ingesta de la dieta artificial tratada. Los valores medios fueron separados utilizando comparaciones apareadas.

Número de huevos por escarabajo en				Porcentaje de huevos eclosionados		
	<i>hunchback</i> Reg1 dsARN	GFP dsARN	Agua	<i>hunchback</i> Reg1 dsARN	GFP dsARN	Agua
Promedio	57.87 (A)	55.29 (A)	68.21 (A)	2.44 (B)	59.45 (A)	57.66 (A)
SEM*	6.82	17.88	14.29	1.44	7.80	4.13

*SEM - Error Estándar de la Media. Las letras entre paréntesis designan niveles estadísticos. Los niveles no conectados por la

misma letra difieren significativamente entre sí ($p < 0.05$).

Unos huevos no eclosionados fueron disecados de cada tratamiento a efectos de examinar el desarrollo embrionario y para estimar las respuestas fenotípicas del ARNi parental (pARNi). Los
5 huevos depositados por hembras de WCR tratadas con GFP dsARN mostraron un desarrollo normal. Figura 4A. En cambio, los huevos depositados por las hembras que habían sido tratadas con *hunchback* Reg1 dsARN mostraron algún desarrollo embrionario dentro del huevo, pero cuando se los disecó, estaban visiblemente
10 acortados y parecían carecer de un número de segmentos abdominales y torácicos, si bien la respuesta era variable entre las larvas individuales. Figura 4B. Por lo tanto, fue un descubrimiento imprevisto y sorprendente de esta invención, que la ingesta de *hunchback* dsARN tiene un efecto letal o inhibidor sobre el
15 crecimiento de las larvas. También es sorprendente e imprevisto que la ingesta de *hunchback* dsARN por las hembras de WCR adultas preñadas tiene una incidencia drástica sobre la producción de huevos y sobre la viabilidad de los huevos, a pesar de lo cual no se observa ningún efecto drástico discernible sobre las hembras adultas
20 propiamente dichas.

Lo precedente documenta claramente la naturaleza sistémica del ARNi en larvas y adultos del gusano occidental de las raíces del maíz, y el potencial de lograr un efecto parental en el que los genes asociados con el desarrollo embrionario son atenuados en los
25 huevos depositados por hembras que habían sido expuestos a

dsARN. Es importante observar que éste es el primer informe de una respuesta de ARN parcial ingerido en gusanos occidentales de las raíces del maíz. Se indica una respuesta sistémica en sobre la base de la observación de la atenuación en tejidos distintos del canal alimenticio en el que tiene lugar una exposición y captación de dsARN. Dado que los insectos en general, y específicamente los gusanos de las raíces, carecen de ARN polimerasa dependiente de ARN que ha sido asociado con la respuesta sistémica en plantas y nematodos, nuestros resultados confirman que el dsARN puede ser incorporado por el tejido intestinal y ser traslocado a otros tejidos (por ejemplo, los ovarios en desarrollo).

La capacidad de atenuación de la expresión de genes que intervienen en el desarrollo embrionario de manera tal que los huevos no eclosionan, ofrece una oportunidad, única en su género, de lograr y mejorar el control de los gusanos occidentales de las raíces del maíz. Dado que los adultos se alimentan preferentemente sobre los tejidos reproductivos aéreos (tales como los estigmas y espigas macho), los gusanos de las raíces adultos pueden ser expuestos a agentes de control iARN mediante la expresión transgénica de dsARN de manera de obtener una protección de las raíces en la generación subsiguiente, por el hecho de impedir que los huevos eclosionen. La entrega del dsARN por medio de la expresión transgénica de dsARN en las plantas de maíz, o mediante el contacto con iARN aplicado en superficie, provee un compañero de apilamiento para otros enfoques transgénicos que apuntan

directamente las larvas y refuerzan la durabilidad general de las estrategias utilizadas en el control de las plagas.

Ejemplo 7: Análisis de PCR en tiempo real

Se aisló ARN total de cuerpos enteros de hembras adultas, machos, larvas eclosionadas de hembras tratadas, y huevos para lo cual se utilizó el kit RNeasy mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) siguiéndose las recomendaciones del fabricante. Antes de la iniciación de la reacción de transcripción, el ARN total fue tratado con ADNasa a efectos de remover cualquier gADN para lo cual se utilizó el kit Quantitech reverse transcription kit (Qiagen, Valencia, CA). Se utilizó ARN total (500 ng) para sintetizar cADN de primera cadena como una plantilla para PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés). El ARN fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm y se informó su pureza mediante electroforesis en gel de agarosa. Los cebadores utilizados para el análisis de qPCR fueron diseñados mediante el software Beacon designer software (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA). Las eficiencias de los pares de cebadores fueron evaluadas utilizando diluciones 5 veces (1: 1/5: 1/25:1/125: 1/625) por triplicado. Las eficiencias de la amplificación fueron superiores al 96.1% para la totalidad de los pares de cebadores de qPCR utilizados en este estudio. Todas las combinaciones de cebadores mostradas en este estudio presentaron una correlación lineal entre la cantidad de plantilla cADN y la cantidad de producto de PCR. Todos los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,99. Se utilizó el

software 7500 Fast System SDS v2.0.6 Software (Applied Biosystems) para determinar la pendiente, los coeficientes de correlación y las eficiencias. Tres replicaciones biológicas, cada una con dos replicaciones técnicas, fueron utilizadas para el análisis por qPCR. Se llevó a cabo el qPCR utilizando el SYBR green kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) y el sistema de detección de 7500 Fast System real-time PCR detection system (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Los parámetros de ciclados de qPCR incluían 40 ciclos cada uno de los cuales consistía en 95°C durante 3 segundos, 58°C durante 30 segundos, como se describe en el protocolo del fabricante (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Al final de cada reacción de PCR, se generó una curva de fusión para confirmar un único pico y para descartar la posibilidad de una formación de dímeros de cebadores y de producto no específico. La cuantificación relativa de los transcritos fue calculada utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$, y normalizada con respecto a β -actina.

Las Figuras 5A-D resumen gráficamente los datos de la Tabla 6 que muestra los niveles de transcripción relativos de *hunchback* y de GFP en huevos, hembras adultas, larvas y machos adultos en comparación con los controles con agua. Hay una reducción sorprendente en los niveles de transcritos en los adultos (machos y hembras) y en los huevos. No hay una reducción en los transcritos en las larvas que eclosionaron de las hembras tratadas.

Tabla 6: Expresión relativa de *hunchback* en huevos, hembras

adultas, machos adultos y larvas expuestos a dsARN en dieta artificial tratada en comparación con GFP y controles de agua. Los valores medios fueron separados utilizando comparaciones apareadas.

5

10

15

Niveles relativos de transcritos en huevos		
Tratamiento	RQ	SEM*
<i>hunchback</i>	0.5178 (B)	0.1555
GFP	2.7186 (A)	1.0044
Agua	1.1416 (AB)	0.1682
Niveles relativos de transcritos-hembras adultas		
Tratamiento	RQ	SEM*
<i>hunchback</i>	0.3492 (B)	0.0582
GFP	0.8586 (A)	0.0517
Agua	0.9573 (A)	0.0756
Niveles relativos de transcritos- machos adultos		
Tratamiento	RQ	SEM*
<i>hunchback</i>	0.6143 (B)	0.2467
GFP	1.0383 (A)	0.1222
Agua	0.9907 (A)	
Niveles relativos de transcritos en larvas		
Tratamiento	RQ	SEM*
<i>hunchback</i>	1.0715 (A)	0
GFP	0.8742 (A)	0.1739
Agua	1.0712 (A)	0.3470

20

*SEM- Error Estándar de la Media. Las letras entre paréntesis designan niveles estadísticos. Los niveles no conectados por la misma letra difieren significativamente entre sí ($p < 0.05$); N = 3 replicaciones biológicas de 10 huevos o larvas/replicación o individuos adultos con dos replicaciones técnicas/muestra).

25

Ejemplo 8: Construcción de vectores de transformación de

plantas

Se ensambla un vector de entrada que aloja un constructo gen diana para la formación de dsARN que comprende segmentos de *hunchback* (SEC ID NO:1), *hunchback* Reg1 (SEC ID NO:3) y/o *hunchback* v1 (SEC ID NO:67), para lo cual se utiliza una combinación de fragmentos sintetizados químicamente (DNA2.0, Menlo Park, CA) y métodos de clonación molecular estándar. La formación de horquilla intramolecular mediante transcritos primarios de ARN es facilitada disponiendo (dentro de una unidad de transcripción) dos copias de un segmento de gen diana en direcciones opuestas entre sí, estando los dos segmentos separados por una secuencia de ligador (por ejemplo, intrón ST-LS1, SEC ID NO:45; Vancanneyt *et al.* (1990) Mol. Gen. Genet. 220:245-250). Por lo tanto, el transcrito de mRNA primario contiene las dos secuencias de segmentos de gen *hunchback* en forma de grandes repeticiones inversas entre sí, separados por la secuencia de ligador. Una copia de un promotor (por ejemplo, ubiquitina 1 de maíz, patente de Estados Unidos 5,510,474; 35S de Virus Mosaico de Coliflor (CaMV, Cauliflower Mosaic Virus; promotores de genes actina del arroz; promotores de ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 del maíz; promotor de histona; promotor de ALS, promotor del gen de faseolina; cab; rubisco; LAT52; Zm13; y/o apg) se utilizan para impulsar la producción del transcrito de horquilla de ARN primario, y un fragmento que comprende una región 3' no traducida, por ejemplo y sin limitación, un gen peroxidasa 5 de maíz (ZmPer5 3'UTR v2;

patente de Estados Unidos 6,699,984), AtUbi10, AtEf1, o StPinII se utiliza para terminar la transcripción del gen expresa –ARN.

Un vector de entrada comprende un constructo *hunchback* v1 de horquilla-ARN (SEC ID NO:46) que comprende un segmento de *hunchback* (SEC ID NO:1), *hunchback* Reg1 (SEC ID NO:3), y *hunchback* v1 (SEC ID NO:67).

Un vector de entrada descrito con anterioridad se utiliza en reacciones de recombinación GATEWAY® estándar con un vector de destino binario típico para producir vectores de transformación de expresión de ARN de *hunchback* para transformaciones, mediadas por *Agrobacterium*, de embriones de maíz.

Un sector binario de control negativo que comprende un urgente que expresa un YFP de horquilla dsARN, se construyen mediante reacciones de recombinación GATEWAY® estándar con un sector de destino binario típico y un vector de entrada. El vector de entrada comprende una secuencia de YFP de horquilla bajo el control de expresión de un promotor de ubiquitina 1 del maíz (como anteriormente) y un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen de peroxidasa 5 de maíz (como anteriormente).

Un vector de destino binario comprende un gen de resistencia contra los herbicidas (ariloxialcanoato dioxigenasa; AAD-1 v3) (patente de Estados Unidos N°. 7838733, y Wright *et al.* (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107:20240-5) bajo la regulación de un promotor operable de la planta (por ejemplo, badnavirus bacilliforme de la caña de azúcar (ScBV) (Schenk *et al.* (1999) Plant Molec. Biol.

39:1221-30) o ZmUbi (patente de Estados Unidos 5.510.474). 5' UTR e intrón de estos promotores, están posicionados entre el extremo 3' del segmento promotor y el codón de inicio de la región codificadora AAD-1. Un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen de lipasa del maíz (Zmlip 3'UTR; patente de Estados Unidos N°. 7,179,902) se utiliza para terminar la transcripción del AAD-1 mARN.

Otro vector binario de control negativo, que comprende un gen que expresa una proteína YFP, se construye mediante reacciones de recombinación GATEWAY® estándar con un vector de destino binario típico y vector de entrada. El vector de destino binario comprende un gen de tolerancia a los herbicidas (ariloxialcanoato dioxigenasa; AAD-1 v3) (descrito con anterioridad) bajo la regulación de expresión de un promotor de ubiquitina 1 del maíz (descrito con anterioridad) y un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen de lipasa de maíz (Zmlip 3'UTR; descrito con anterioridad). El vector de entrada comprende una región codificadora de YFP bajo el control de expresión de un promotor ubiquitina 1 del maíz (descrito con anterioridad) y un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen de peroxidasa 5 del maíz (descrito con anterioridad).

La SEC ID NO:46 presenta una secuencia formadora de *hunchback* v1 de horquilla.

Ejemplo 9: Tejidos de maíz transgénico que comprenden dsARN insecticidas

Transformación mediada por Agrobacterium. Se produjeron células de maíz transgénico, tejidos, y plantas que producen una o más moléculas dsARN insecticidas (por ejemplo, por lo menos una molécula de dsARN lo que incluye una molécula de dsARN que apunta a un gen que comprende segmentos de *hunchback* (SEC ID NMO:1), *hunchback* Reg 1 (SEC ID NO:3), y *hunchback* v1 (SEC ID NO:67) por medio de la expresión de un gen quimérico establemente integrado en el genoma de la planta, después de la transformación mediada por Agrobacterium. Los métodos para la transformación del maíz en los que se utilizan vectores de transformación superbinarios o binarios se conocen en técnica y han sido descritos por ejemplo en la patente de Estados Unidos N°. 8,304,604, incorporada en la presente como referencia en su totalidad. Se seleccionan tejidos transformados en base a su capacidad de crecer en un medio que contiene Haloxifop, y se los seleccionó para la producción de dsARN, de manera adecuada. Es posible presentar porciones de tales cultivos de tejido transformados a larvas de gusano de raíz neonatos para un ensayo biológico, esencialmente como se describe en el EJEMPLO 1.

Iniciación del cultivo con Agrobacterium: Unas reservas en glicerol de células de Agrobacterium cepa DAt13192 (WO 2012/016222A2) que alojaban un vector de transformación binario pDAB108819 o pDAB114245 anteriormente descritos (Ejemplo 4) fueron untadas sobre placas de medio mínimo AB (Watson, *et al.*, (1975) J. Bacteriol. 123:255-264) que contenían antibióticos

adecuados, y se las cultivó a 20°C durante 3 días. Los cultivos fueron seguidamente untados en placas YEP (en gm/L: extracto de levadura, 10; peptona, 10; NaCl 5) que contenían los mismos antibióticos, y se las incubó a 20°C durante 1 día.

5 Cultivo de Agrobacterium. En el día del experimento, se preparó una solución de trabajo de medio de inoculación y acetosiringona en un volumen adecuado para el número de constructos en el experimento y se la introdujo mediante pipeteo en un frasco estéril, descartable, de 250 ml. El medio de inoculación
10 (Frame *et al.* (2011) Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos. IN Plant Embryo Culture Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. T. A. Thorpe y E. C. Yeung, (Eds), Springer Science y Business Media, LLC. pp 327-341) contenía: 2.2 gm/l de sales MS; vitaminas MS 1X ISU Modificadas (Frame *et al.*,
15 *ibid.*) 68.4 gm/l sacarosa; 36 gm/l de glucosa; 115 mg/l de L-prolina; y 100 mg/l de mio-inositol; a pH 5.4.) Se añadió acetosiringona al frasco que contenía el medio de inoculación hasta obtener una concentración final de 200 µM de una solución madre 1 M en dimetilsulfóxido al 100%, y se mezcló la solución intensivamente.

20 Para cada constructo, 1 ó 2 cantidades de Agrobacterium de la placa de YEP fueron suspendidas en 15 ml de la solución madre del medio de inoculación/acetosiringona en un tubo de centrifugadora estéril, descartable, de 50 ml, y se midió la densidad óptica a 550 nm (OD₅₅₀) en un espectrofotómetro. La suspensión fue seguidamente
25 diluida a un OD₅₅₀ de 0.3 a 0.4 para lo cual se utilizó una cantidad

adicional de la mezcla de medio de inoculación/acetosiringona. El tubo con la suspensión de *Agrobacterium* fue colocado horizontalmente sobre un dispositivo de agitación ajustado a aproximadamente 75 rpm a temperatura ambiente, y se sometió a la agitación durante de 1 a 4 horas mientras se llevaba a cabo la disección de los embriones.

Esterilización de las mazorcas y aislación de los embriones: Se obtuvieron embriones de maíz inmaduros de plantas de *Zea mays* línea autofecundada B104 (Hallauer *et al.* (1997) Crop Science 37:1405-1406) cultivados en invernadero y autopolinizadas o subpolinizadas para producir mazorcas. Se cosecharon las mazorcas a aproximadamente 10 a 12 días después de la polinización. En el día del experimento, las mazorcas deshojadas fueron esterilizadas superficialmente por inmersión en una solución de blanqueador comercial al 20% (ULTRA CLOROX® Germicidal Bleach, 6,15% hipoclorito de sodio; con dos gotas de TWEEN 20) y se sometieron a agitación durante 20 a 30 minutos, seguido por 3 enjuagues con agua estéril desionizada en un gabinete de flujo laminar. Unos embriones cigotos (de 1.8 a 2.2 mm de longitud) fueron disecados asépticamente de cada mazorca, y distribuidos aleatoriamente en tubos de microcentrifugación que contenían 2.0 ml de una solución de células adecuadas de *Agrobacterium* en un medio de inoculación líquido con 200 μ M de acetosiringona, en la que se habían añadido 2 μ l de agente tenso activo BREAK-THRU® S233 al 10% (EVONIK INDUSTRIES; Essen, Alemania). Para un conjunto de experimentos,

se utilizaron embriones de mazorcas unificadas para cada transformación.

Cocultivo con Agrobacterium. Después de la aislación, los embriones fueron colocados sobre una plataforma mecedora durante 5 minutos. El contenido del tubo fue seguidamente vertido sobre una placa de medio de cocultivo, que contenía 4.33 gm/l de sales; 1X ISU Modified MS Vitamins; 30 gm/l de sacarosa; 700 mg/l de L-prolina; 3.3 mg/l de Dicamba in KOH (ácido 3,6-dicloro-o-anísico o ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico); 100 mg/l de mioinositol; 100 mg/l de hidrolizado enzimático de caseína; 15 mg/l de AgNO₃; 200 µM de acetosiringona en DMSO; y 3 gm/l de GELZAN™, a pH 5.8. La suspensión líquida de Agrobacterium fue removida mediante una pipeta de transferencia estéril, descartable. Los embriones fueron seguidamente orientados estando su escutelo orientado para lo cual se utilizó un fórceps estéril con ayuda de un microscopio. La placa fue cerrada, sellada con cinta médica 3M™ MICROPORE™, y colocada en una incubadora a 25°C bajo luz continúa a aproximadamente con 60 µmol m⁻²s⁻¹ de PAR (Photosynthetically Active Radiación, Radiación Fotosintéticamente Activa).

Selección de los callos y regeneración de acontecimientos transgénicos. Después del período de cocultivo, los embriones fueron transferidos a un Medio de Reposo, que estaba compuesto de 4,33 gm/l de sales MS; 1X ISU Modified MS Vitamins; 30 gm/l de sacarosa; 700 mg/l de L-prolina; 3,3 mg/l de Dicamba en KOH; 100 mg/l de mioinositol; 100 mg/l de hidrolizado enzimático de caseína;

15 mg/l de AgNO_3 ; 0.5 gm/l de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico monohidratado; PHYTOTECNOLOGIES LABR.; Lenexa, KS); 250 mg/l de carbenicilina; y 2.3 gm/l de GELZAN™; a pH 5.8. No más de 36 embriones fueron movidos a cada placa. Las placas fueron colocadas en una caja de material plástico transparente, y se la sometió a incubación a 27°C bajo luz continua a aproximadamente $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR durante de 7 a 10 días. Los embriones en forma de callos fueron seguidamente transferidos (<18/placa) en Medio de Selección I, que comprendía Medio de Reposo (anteriormente descrito) con 100 nM de ácido R-Haloxifop (0,0362 mg/l; para la selección de callos que alojan el gen AAD-1). Las placas fueron devueltas a cajas de material plástico transparente y sometidas a incubación a 27°C bajo luz continúa a aproximadamente $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR durante 7 días. Los embriones en forma de callos fueron seguidamente transferidos (<12/placa) a Medio de Selección II, que comprende Medio de Reposo (descrito con anterioridad) con 500 nM de ácido nM R-Haloxifop (0,181 mg/l). Las placas fueron llevadas de regreso a cajas transparentes y fueron sometidas a incubación a 27°C bajo luz continúa a aproximadamente $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR durante 14 días. Esta etapa de selección permitió que los callos transgénicos proliferaran y se diferenciaron en mayor grado.

Los callos embriogénicos proliferantes fueron transferidos (<9/placa) a Medio de Regeneración. El Medio de Regeneración contenía 4.33 gm/l de sales MS; 1X ISU Modified MS Vitaminas; 45

gm/l de sacarosa; 350 mg/l de L-prolina; 100 mg/l de mioinositol; 50 mg/l de Hidrolizado Enzimático de Caseína; 1.0 mg/l de AgNO_3 ; 0.25 gm/l de MES; 0.5 mg/l de ácido naftalenacético en NaOH; 2.5 mg/l de ácido abscísico en etanol; 1 mg/l de 6-bencilaminopurina; 250 mg/l de carbenicilina; 2.5 gm/l DE GELZAN™; y 0.181 mg/l de ácido Haloxifop; a pH 5.8. Las placas fueron guardadas en cajas transparentes y sometidas a incubación a 27°C bajo luz continua a aproximadamente $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR durante 7 días. Los callos en regeneración fueron seguidamente transferidos (<6/placa) a Medio de Regeneración en PHYTATRAYS™ (SIGMA-ALDRICH) y sometidas a incubación a 28°C bajo ciclos de luz de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad por día (a aproximadamente $160 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR) durante 4 días o hasta que se desarrollaron brotes y raíces. El Medio de Regeneración contenía 4.3 gm/l de sales MS; 1X ISU Modified MS Vitamins; 60 gm/l de sacarosa; 100 mg/l de mioinositol; 125 mg/l de carbenicilina; 3 gm/l de goma GELLAN™; y 0.181 mg/l de ácido R-Haloxifop; a pH 5.8. Los brotes pequeños con raíces primarias fueron seguidamente aislados y transferidos a Medio de Elongación sin selección. El Medio de Elongación contenía 4.33 gm/l de sales MS; 1X ISU Modified MS Vitamins; 30 gm/l de sacarosa; y 3.5 gm/l de GELRITE™: a pH 5.8.

Los brotes de planta transformados seleccionados en base a su capacidad de crecer en un medio que contenía Haloxifop fueron trasplantados de PHYTATRAYS™ a pequeñas macetas llenas de medio de cultivo (PROMIX BX; PREMIER TECH HORTICULTURE),

cubiertas con tazas o HUMI-DOMES (ARCO PLASTICS), y seguidamente se las endureció en una cámara de cría CONVIRON (A 27°C día/24°C noche), fotoperíodo de 16 horas, 50-70% de humedad relativa, 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR). En algunos casos, las potenciales

5 plántulas transgénicas fueron analizadas para establecer el número de copias relativas de transgén mediante ensayos de PCR en tiempo real para lo cual se utilizaron cebadores diseñados para detectar la gente de tolerancia a los herbicidas AAD1 integrado en el genoma del maíz. Además, se utilizaron ensayos qPCR de ARN para detectar

10 la presencia de la secuencia de intrón ST-LS1 en los dsARN expresados de potenciales transformantes. Las plantas transformadas seleccionadas fueron seguidamente llevadas a un invernadero para continuar con su cultivo y ensayo.

Transferencia y establecimiento de plantas T_0 en el

15 invernadero para ensayos biológicos y para la producción de semillas. Cuando las plantas llegaron a la etapa V3-V4, fueron transferidas a una mezcla de suelos IE CUSTOM BLEND (PROFILE/METRO MIX 160) y cultivadas hasta floración en el invernadero (tipo de exposición a la luz: foto o asimilación; límite de

20 luz elevado: 1200 PAR; duración 16 horas por día, 27°C día/24°C noche).

Las plantas destinadas a ser utilizadas para ensayos biológicos con insectos fueron trasplantadas de macetas pequeñas a TINUS™ 350-4 ROOTRAINERS® (SPENCER-LEMAIRE INDUSTRIES, Acheson,

25 Alberta, Canadá;) (una planta por acontecimiento por

ROOTRAINER®). Aproximadamente 4 días después de su trasplante a ROOTRAINERS®, las plantas se utilizaron en ensayos biológicos.

Las plantas de la generación T₁ fueron obtenidas mediante la polinización de los estigmas de plantas transgénicas T₀ con polen recolectado de plantas de línea autofecundada de élite no transgénica B104 o con otros donantes adecuados de polen, plantándose las semillas resultantes. En la medida de lo posible se efectuaron cruces recíprocos.

Ejemplo 10: Ensayo biológico de alimentación de *Diabrotica* adultos con plantas

Un follaje de maíz transgénico (V3-4) que expresa dsARN para dianas ARNi parentales y controles de GFP son liofilizado y molido en forma de un polvo fino con pisón y mortero, y se hace pasar a través de una criba de 600 µm a efectos de obtener partículas de tamaño uniforme antes de su *captación* en una dieta artificial. La dieta artificial es la misma dieta anteriormente descrita para los experimentos de ARNi parental con la salvedad que la cantidad del agua es del doble (20 ml de H₂O, 0.40 g de agar, 6.0 de dieta mezcla, 700 µl de glicerol, 27.5 µl de inhibidor de mohos). Antes de la solidificación, el tejido de hoja de maíz liofilizado es incorporado en la dieta a razón de 40 mg/ml de dieta, y se mezcla intensivamente. Seguidamente se vierte la mezcla sobre la superficie de un plato de Petri de material plástico hasta una profundidad de aproximadamente 4 mm y se le permite solidificarse. Se recortan tarugos de dieta del material de dieta, y se los utiliza para exponer

los ejemplares adultos de gusanos de las raíces del maíz para lo cual se utilizan los mismos métodos que los anteriormente descritos por los experimentos con ARNi parental.

Los eventos de pARNi T_0 o T_1 son cultivados en invernadero hasta que las plantas producen mazorcas, espigas macho y estigmas. Se libera un total de 25 ejemplares adultos de raíz de los gusanos recién emergidos sobre cada planta, y la totalidad de la planta es recubierta a efectos de impedir que los adultos se escapen. Dos semanas después de la liberación, se recuperan las hembras de cada planta y se las mantiene en el laboratorio para la recolección de los huevos. En función de la diana de ARNi parental ARNi y del fenotipo previsto, se registran parámetros tales como el número de huevos por hembra, el porcentaje de eclosión de los huevos, y la mortalidad larval, y se los compara con los de las plantas de control.

EJEMPLO 11: Ensayo biológico de la alimentación de larvas de *Diabrotica* en maíz transgénico

Ensayos biológicos con insectos: La bioactividad del dsARN de la presente invención en las células de planta se demuestra mediante métodos de ensayo biológico. Es posible demostrar la eficacia, por ejemplo, alimentando con diversos tejidos de planta o piezas de tejido derivados de una planta que produce un dsARN insecticida, a insectos diana en un entorno de alimentación controlado. Como alternativa, se preparan extractos de diversos tejidos de planta derivados de una planta que produce el dsARN insecticida, y los ácidos nucleicos extraídos son entregados sobre la

parte superior de dietas artificiales para ensayos biológicos anteriormente descritos en la presente. Los resultados de tales ensayos de alimentación se comparan con ensayos biológicos llevados a cabo de manera similar que utilizan tejidos de control
5 adecuados de plantas anfitrión que no producen un dsARN insecticida, o con otras muestras de control.

Ensayos biológicos con eventos transgénicos de maíz. Dos larvas de gusano occidental de las raíces del maíz (de 1 a 3 días de edad) eclosionadas de huevos lavados fueron seleccionadas y
10 colocadas en cada cavidad de la bandeja de ensayo biológico. Las cavidades fueron seguidamente cubiertas con una cubierta "PULL N' PEEL" (BIO-CV-16, BIO-SERV) y colocadas en una incubadora a 28°C con un ciclo de luz y oscuridad de 18 horas/6 horas. Nueve días después de la infestación inicial, las larvas son evaluadas para
15 establecer su mortalidad, que se calcula como el porcentaje de insectos muertos de entre un número total de insectos en cada tratamiento. Las muestras de insectos son congeladas a -20°C durante dos días, y seguidamente las larvas de insectos de cada tratamiento son reunidas y pesadas. Se calcula el porcentaje de
20 inhibición del crecimiento como el peso medio de los tratamientos experimentales dividido por el valor medio del peso promedio de dos tratamientos en las cavidades de control. Los datos se expresan como inhibición porcentual del crecimiento (de los controles negativos). Los pesos medios que superan el peso medio son
25 normalizados en cero.

Ensayos biológicos en el invernadero. Unos huevos de gusano occidental de las raíces del maíz (WCR, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) son recibidos en un suelo de CROP CHARACTERISTICS (Farmington, MN). Los huevos de WCR fueron incubados a 28°C durante de 10 a 11 días. Se retiró la tierra de los huevos por lavado, se los colocó en una solución de agar al 0.15%, y se ajustó la concentración aproximadamente a de 75 a 100 huevos por cada alícuota de 0.25 ml. Se estableció una placa de eclosión en un plato de Petri con una alícuota de suspensión de huevos para supervisar los coeficientes de eclosión.

El suelo alrededor de las plantas de maíz que crecían en ROOTRAINERS® fue infestado con de 150 a 200 huevos de WCR. Se permitió a los insectos alimentarse durante dos semanas, después de lo cual se asignó un “coeficiente de raíz” a cada planta. Se utilizó una escala de lesiones en los nodos para la evaluación, esencialmente de acuerdo con Oleson *et al.* (2005, J. Econ. Entomol. 98:1-8). Las plantas que aprueban este ensayo biológico fueron trasplantadas a pots de 18.9 litros para la producción de semillas. Los trasplantes fueron tratados con insecticida para impedir mayor daño por los gusanos de las raíces y la liberación de los insectos en los invernaderos. Las plantas fueron polinizadas manualmente para la producción de semillas. Las semillas producidas por estas plantas fueron guardadas para su evaluación en la generación T₁ y en las generaciones futuras, de las plantas.

Los ensayos biológicos en invernadero incluyen dos tipos de

plantas de control negativo. Las plantas de control transgénicas negativos fueron generadas por transformación con vectores que alojan genes diseñados para producir una proteína fluorescente verde (YPF, por sus siglas en inglés) o un dsARN de horquilla de YPF (Véase el Ejemplo 4). Las plantas de control negativos no transformadas fueron cultivadas a partir de semillas de la línea B104. Los ensayos biológicos se llevan a cabo en dos fechas distintas, habiendo controles negativos incluidos en cada conjunto de materiales de planta.

10 **Ejemplo 12: Análisis molecular de tejidos de maíz transgénico**

Se llevaron a cabo análisis moleculares (por ejemplo ARN qPCR) de tejido de maíz sobre hojas y raíces que fueron recolectados de plantas cultivadas en invernadero en el mismo día en que se evaluó el daño infligido por los insectos que se alimentan de las raíces.

Se utilizaron los resultados de los ensayos ARN qPCR para el Per5 3'UTR para validar la expresión de los transgenes de horquilla. (Se prevé un bajo nivel de detección de Per5 3'UTR en las plantas de maíz no transformadas, ya que usualmente hay una expresión del gen de Per5 endógeno en los tejidos de maíz). Los resultados de los ensayos ARN qPCR para la secuencia de intervención entre secuencias de repetición (que es parte integral de la formación de las moléculas de horquilla de dsARN) en los ARN expresados fueron utilizados por validar la presencia de los transcritos de horquilla. Se midieron los niveles de expresión de ARN de transgén en

comparación con los niveles de ARN de un gen de maíz endógeno.

Se utilizaron análisis de ADN qPCR para detectar una porción de la región codificadora AAD1 en ADN genómico para estimar el número de copias de inserción del transgén. Se recolectaron muestras para estos análisis de plantas que habían sido cultivadas en cámaras ambientales. Se compararon los resultados con los resultados de ADN qPCR de ensayos diseñados para detectar una porción del gen nativo de una sola copia, y los eventos simples (que tienen una o dos copias de transgenes) fueron anticipados para estudios ulteriores en el invernadero.

Adicionalmente, se utilizaron ensayos de qPCR diseñados para detectar una porción del gen de resistencia a la espectinomicina (SpecR; alojado sobre los plásmidos vectores binarios fuera del T-ADN) para determinar si las plantas transgénicas contenían secuencias de columna vertebral integrados extraños.

Nivel de expresión de transcripto de ARN de horquilla: por 5 3' UJTR qPCR: Se analizaron eventos de células de callos o plantas transgénicas mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés) de la secuencia por 5 3'UTR para determinar el nivel de expresión relativo del transcrito de horquilla de longitud completa, en comparación con el nivel de transcripto de un gen de maíz interno (por ejemplo, número de acceso a GENBANK BT069734), que codifica una proteína similar a TIP41 (es decir, un maíz homólogo de número de acceso a GENBANK AT4G34270; que tiene un puntaje tBLASTX de 74% de identidad).

Se aisló el ARN utilizando un kit ARNEASY™ 96 (QIAGEN, Valencia, CA). Después de la elución, el ARN total fue sometido a un tratamiento con ADN de acuerdo con el protocolo sugerido en el kit. El ARN fue seguidamente cuantificado en un espectrómetro
5 NANODROP 8000 (THERMO SCIENTIFIC) y se normalizó la concentración a 25 ng/μl. Se preparó cADN de primera cadena utilizando un kit HIGH CAPACITY cADN SYNTHESIS (INVITROGEN) en un volumen de reacción con 5 μl de ARN desnaturalizado, sustancialmente de acuerdo con el protocolo
10 recomendado por el fabricante. El protocolo fue modificado ligeramente mediante la adición de 10 μl de 100 μM T₂OVN oligonucleótido (IDT) (TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN, donde V es A, C, o G, y N es A, C, G, o T; SEC ID NO: 47) en el tubo de 1 ml de mezcla madre de cebador aleatorio, a efecto de preparar una
15 solución madre de cebadores aleatorios combinados y oligo dT.

Después de la síntesis de cADN, las muestras fueron diluidas 1:3 con agua libre de nucleasa, y almacenadas a -20°C hasta los ensayos.

Se llevaron a cabo ensayos de PCR en tiempo real separados
20 para Per5 3' UTR y para el transcrito similar a IP41 en un LIGHTCYCLER™ 480 (ROCHE DIAGNOSTICS, Indianápolis, IN) en volúmenes de reacción de 10 μl. Para el ensayo con Per5 3'UTR, las reacciones fueron efectuadas con los Cebadores P5U76S (F) (SEC ID NO:48) y P5U76A (R) (SEC ID NO:49), y con un ROCHE
25 UNIVERSAL PROBE™ (UPL76; número de catálogo 4889960001;

etiquetado con FAM). Para el ensayo con el gen de referencia similar a TIP41, se utilizaron los cebadores TIPmxF (SEC ID NO:50) y TIPmXR (SEC ID NO:51), y la Sonda HXTIP (SEC ID NO:52) etiquetado con HEX (hexaclorofluoresceína).

5 Todos los ensayos incluyeron controles negativos de no plantilla (mezcla solamente). Para las curvas estándar, también se incluyó un “en blanco” (agua en la cavidad de fuente) en la placa de fuente a efectos de verificar una contaminación cruzada de la muestra. Las secuencias de cebadores y de sondas han sido
10 indicadas en la Tabla 7. Las recetas para los componentes de reacción a efectos de la detección de los diversos transcritos se divulgan en la Tabla 8, y las condiciones de reacción para el PCR han sido resumidas en la Tabla 9. La parte fluorescente FAM (6-carboxifluoresceinamidita) fue sometida a excitación a 465 nm y se
15 midió la fluorescencia a 510 nm; los valores correspondientes a la parte fluorescente HEX (hexaclorofluoresceína) eran de 533 nm y 580 nm.

20 Tabla 7. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para los análisis moleculares de los niveles de transcritos en el maíz transgénico

Diana	Oligonucleótido	b ID NO.	Secuencia
Per5 3'UTR	P5U76S (F)	48	TTGTGATGTTGGTGGCGTAT
Per5 3'UTR	P5U76A (R)	49	TGTTAAATAAAACCCCAAAGATCG
Per5 3'UTR	Roche UPL76 (FAM-Sonda)	NAv**	Número de catálogo de diagnóstico Roche 488996001
25 TIP41	TIPmxF	50	TGAGGGTAATGCCAACTGGTT

TIP41	TIPmxR	51	GCAATGTAACCGAGTGTCTCTCAA
TIP41	HXTIP (HEX-Sonda)	52	TTTTTGGCTTAGAGTTGATGGTGTACTGATGA

*Proteína similar a TIP41.

5 **NAv Secuencia no disponible por el proveedor.

Tabla 8. Recetas de reacción de PCR para la detección de transcritos.

	Per5 3'UTR	Gen similar a TIP
Componente	Concentración final	
Tampón Roche	1 X	1X
P5U76S (F)	0.4 µM	0
P5U76A (R)	0.4 µM	0
Roche UPL76 (FAM)	0.2 µM	0
HEXtipZM F	0	0.4 µM
HEXtipZM R	0	0.4 µM
HEXtipZMP (HEX)	0	0.2 µM
cADN (2.0 µL)	NA	NA
Agua	Hasta 10 µL	Hasta 10 µL

Tabla 9. Condiciones de termociclador para ARN qPCR.

Detección de genes Per5 3'UTR y similar a TIP41			
Proceso	Temp.	Duración	No. de ciclos
Activación de diana	95 °C	10 min	1
Desnaturalizar	95 °C	10 seg	40
Extensión	60 °C	40 seg	
Adquirir FAM o HEX	72 °C	1 seg	
Enfriar	40 °C	10 seg	1

Los datos fueron analizados utilizando software LIGHTCYCLER™ v1.5 mediante cuantificación relativa utilizándose

un algoritmo max de segunda derivada para el cálculo de los valores de Cq de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Para los análisis de expresión, se calcularon los valores de expresión utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ (es decir, $2^{-(Cq \text{ diana} - Cq \text{ REF})}$), que se basa en la comparación de las diferencias de los valores de Cq entre dos dianas, seleccionándose el valor de base 2 bajo la suposición que, para condiciones de PCR optimizadas, el producto se duplica en cada ciclo.

Tamaño e integridad del transcripto de horquilla: Ensayo de transferencia Northern: En algunos casos se obtiene una caracterización molecular adicional de las plantas transgénicas mediante el uso del análisis de transferencia Northern (transferencia de ARN) para determinar el tamaño molecular del ARN de horquilla de *hunchback* en las plantas transgénicas que expresan un dsARN de horquilla de *hunchback*.

Todos los materiales y equipos son tratados con ARNZAP (AMBION/INVITROGEN) antes de su utilización. Se recolectan muestras de tejidos (de 100 mg a 500 mg) en tubos de 2 ml SAFELOCK EPPENDORF, se desintegra con un pulverizador de tejidos KLECKO™ (GARCIA MANUFACTURING, Visalia, CA) con tres perlas de tungsteno en 1 ml de TRIZOL (INVITROGEN) durante 5 min, y seguidamente se somete a incubación a temperatura ambiente (RT, por sus siglas en inglés) durante 10 min. Opcionalmente, las muestras son sometidas a centrifugación durante 10 min a 4°C a 11.000 rpm y el material sobrenadante es transferido a un tubo

fresco de 2 ml SAFELOCK EPPENDORF. Después de haberse
añadido 200 µl de cloroformo al material homogeneizado, se mezcla
el tubo mediante inversión durante de 2 a 5 minutos, se incuba a
temperatura ambiente durante 10 minutos, y se somete a
5 centrifugación a 12,000 x g durante 15 min a 4°C. La fase superior
es transferida a un tubo estéril de 1,5 ml EPPENDORF, se añaden
600 µl de isopropanol al 100%, seguido por incubación a temperatura
ambiente durante de 10 minutos a 2 horas, después de lo cual se
somete a centrifugación a 12.000 x g durante 10 min a una
10 temperatura de 4° a 25°C. Se descarta el material sobrenadante y
las pellas de ARN son lavadas dos veces con 1 ml de etanol al 70%,
con una centrifugación a 7.500 x g durante 10 min a una temperatura
de 4° a 25°C entre los lavados. Se descarta el etanol y el material
granulado se seca brevemente al aire durante de 3 a 5 min antes de
15 ser resuspendido en 50 µl de agua libre de nucleasa.

Se cuantifica el ARN total utilizando el NANODROP8000®
(THERMO-FISHER) y las muestras son normalizadas a 5 µg/10 µl.
Seguidamente se añaden 10 µl de glioxal (AMBION/INVITROGEN) a
cada muestra. De 5 a 14 ng de mezcla de marcador estándar DIG
20 ARN (ROCHE APPLIED SCIENCE, Indianápolis, IN) son dispersados
y añadidos a un volumen igual de glioxal. Las muestras y los ARNs
marcadores son desnaturalizados a 50°C durante 45 min y guardados
sobre hielo hasta su carga en gel de SEAKEM GOLD agarosa al
1,25% (LONZA, Allendale, NJ) en tampón corriente de
25 NORTHERNMAX 10 X glioxal (AMBION/INVITROGEN). Los ARN son

separados mediante electroforesis a 65 voltios/30 mA durante 2 horas y 15 min.

Después de la electroforesis, se enjuaga el gel en 2X SSC durante 5 min y se forman imágenes en una estación GEL DOC (BIORAD, Hercules, CA), después de lo cual el ARN es transferido pasivamente a una membrana de nylon (MILLIPORE) durante la noche a temperatura ambiente, utilizándose 10X SSC como tampón de transferencia (el 20X SSC consiste en 3 M cloruro de sodio y 300 mM de citrato trisódico, pH 7,0). Después de la transferencia, la membrana se enjuaga en 2X SSC durante 5 minutos, el ARN es reticulado por radiación ultravioleta a la membrana (AGILENT/STRATAGENE), y se permite que la membrana se seque a temperatura ambiente durante hasta 2 días.

La membrana es prehibridada en tampón ULTRAHYB (AMBION/INVITROGEN) durante de 1 a 2 horas. La sonda consiste en un producto amplificado por PCR que contiene la secuencia de interés (por ejemplo, la porción de secuencia antisentido de la SEC ID NO:14 o de la SEC ID NO:15, según corresponda) etiquetada con digoxigenina mediante un procedimiento de ROCHE APPLIED SCIENCE DIG. La hibridación en el tampón recomendado tiene lugar durante la noche a una temperatura de 60°C en tubos de hibridación. Después de la hibridación, la transferencia es sometida a lavados con DIG, se lo envuelve, se lo expone a película durante de 1 a 30 minutos, después de lo cual se revela la película, todo esto de acuerdo con los métodos recomendados por el proveedor del kit de

DIG.

Determinación del número de copias de transgén. Se recolectaron piezas de hojas de maíz aproximadamente equivalentes a dos puñados de hojas en placas de recolección de 96 cavidades (QIAGEN). La desintegración del tejido fue llevada a cabo con un pulverizador de tejidos KLECKO™ (GARCIA MANUFACTURING, Visalia, CA) en tampón de lisis BIOSPRINT96 AP1 (suministrado junto con un kit BIOSPRINT96 PLANT; QIAGEN) con una perla de acero inoxidable. Después de la maceración de los tejidos, se aisló el ADN genómico (gADN) en un formato de elevado rendimiento utilizando un kit BIOSPRINT96 PLANT y un robot de extracción. El ADN genómico fue diluido con 2:3 ADN:agua antes de establecer la reacción de qPCR

Análisis mediante pPCR: La detección de transgenes mediante ensayo de sonda de hidrólisis fue llevada a cabo mediante PCR en tiempo real utilizando un sistema LIGHTCYCLER®480. Los oligonucleótidos a ser utilizados en los ensayos de sondas por hidrólisis para detectar la secuencia de intrón ST-LS1 (SEC ID NO: 45), o para detectar una porción del gen SpecR (es decir, el gen de resistencia a la espectinomicina llevado en los plásmidos vectores binarios; SEC ID NO:53; oligonucleótidos SPC1 en la Tabla 10), fueron diseñados utilizando el software LIGHTCYCLER® PROBE DESIGN SOFTWARE 2.0. Además, los oligonucleótidos hacer utilizados en los ensayos de sondas de hidrólisis para detectar un segmento del gen de tolerancia al herbicida AAD-1 (SEC ID NO:54;

los oligonucleótidos GAAD1 en la Tabla 10) fueron diseñados utilizando software PRIMER EXPRESS (APPLIED BIOSYSTEMS). La Tabla 10 muestra las secuencias de los cebadores y sondas. Los ensayos fueron multiplexados con reactivos para un gen cromosómico del maíz endógeno (Invertasa; GENBANK Accession No: U16123; que en la presente recibe la denominación de IVR1), que sirvió como una secuencia de referencia interna. Para la amplificación, se preparó una mezcla LIGHTCYCLER®480 PROBES MASTER (ROCHE APPLIED SCIENCE) con una concentración final 1x en una reacción múltiplex con un volumen de 10 µl que contenía 0,4 µM de cada cebador y 0,2 µM de cada sonda (Tabla 11). Se llevó a cabo una reacción de amplificación de dos etapas como se destaca en la Tabla 12. La activación del fluoróforo y la emisión para las sondas etiquetadas con FAM- y HEX- fueron como se describe con anterioridad; los conjugados CY5 son sometidos a una excitación máxima a 650 nm y la fluorescencia máxima a 670 nm.

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

Nombre	SEQ ID	Secuencia
	NO:	
ST-LS1- F	55	GTATGTTTCTGCTTCTACCTTTGAT
ST-LS1- R	56	CCATGTTTTGGTCATATATTAGAAAAGTT
ST-LS1-P (FAM)	57	AGTAATATAGTATTTCAAGTATTTTTTCAAAT
GAAD1-F	58	TGTTTCGGTTCCTCTACCAA
GAAD1-R	59	CAACATCCATCACCTTGACTGA

Nombre	SEQ ID	
	NO:	Secuencia
GAAD1-P (FAM)	60	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA
IVR1-F	61	TGGCGGACGACGACTTGT
IVR1-R	62	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT
IVR1-P (HEX)	63	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC
SPC1A	64	CTTAGCTGGATAACGCCAC
SPC1S	65	GACCGTAAGGCTTGATGAA
TQSPEC (CY5*)	66	CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA

CY5 = Cianina-5

Tabla 11. Componentes de reacción para los análisis del número de copias del gen y para la detección de la columna vertebral de plásmido.

Componente	Amt. (µL)	Material de trabajo	Concentración final
Tampón 2x	5.0	2x	1x
Cebadores directo adecuado	0.4	10 µM	0.4
Cebador inverso adecuado	0.4	10 µM	0.4
Sonda adecuada	0.4	5 µM	0.2
Cebador directo IVR1	0.4	10 µM	0.4
Cebador inverso IVR1	0.4	10 µM	0.4
Sonda IVR1	0.4	5 µM	0.2
H ₂ O	0.6	NA*	NA
gADN	2.0	ND**	ND
Total	10.0		

*NA = No aplicable

**ND = No se determinó

Tabla 12. Condiciones de termociclador para ADN qPCR.

Análisis del número de copias genómicas

Análisis del número de copias genómicas

Proceso	Temp.	Duración	Cantidad de ciclos
Activación de Dian	95 °C	10 min	1
Desnaturalizar	95 °C	10 seg	40
Extender & Adquirir FAM, HEX, o CY5	60 °C	40 seg	
Enfriar	40 °C	10 seg	1

Ejemplo 13: *Zea mays* transgénico que contiene secuencias de plaga de coleópteros

Se generan de 10 a 20 plantas T_0 de *Zea mays* Transgénico como se describe en el Ejemplo 8. Se obtienen otras líneas de 10 - 20 T_1 de *Zea mays* independientes que expresan de horquilla dsARN para un constructo ARNi, para exponerlos a gusanos de las raíces del maíz. El de horquilla dsARN puede derivarse de una secuencia establecida en SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, y SEC ID NO:67. Es posible derivar de horquilla dsARN adicionales, por ejemplo, a partir de secuencias de plagas de coleópteros tales como, por ejemplo, Caf1-180 (publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N°. 2012/0174258), VatpaseC (publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N°. 2012/0174259), Rho1 (publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N°. 2012/0174260), VatpaseH (publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N°. 2012/0198586), PPI-87B (publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N°. 2013/0091600), RPA70 (publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N°. 2013/0091601), RPS6 (publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N°. 2013/0097730),

Brahma (USSN), y Kruppel (USSN). Los mismos se confirman mediante RT-PCR u otros métodos de análisis molecular. Los preparados de ARN total de líneas T₁ independientes utilizados para qPCR con cebadores diseñados para ligarse en el ligador del casete de expresión de horquilla en cada uno de los constructos de ARNi. Además, ocasionalmente se utilizan cebadores específicos para cada gen diana en un constructo de ARNi para amplificar y confirmar la producción del mARN preprocesado requerido para la producción de siARN *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen diana confirma la expresión del AREN de horquilla en cada planta de *Zea mays* transgénica. El procesamiento del dsARN de horquilla de los genes diana de manera de obtener siARN es suficientemente confirmado de manera opcional en líneas transgénicas independientes para lo cual se utilizan hibridaciones blot de ARN.

Por otra parte, las moléculas de ARNi que tiene secuencias de falta de concordancia con más del 80% de identidad de secuencias, influyen sobre los gusanos de las raíces del maíz de la misma manera que la observada con las moléculas de ARNi que tienen una identidad de secuencias del 100% con respecto a los genes diana. El apareamiento de secuencias de falta de concordancia con secuencias nativas de manera de formar un dsARN de horquilla en el mismo constructor de dsARN entrega siARN procesadas en planta capaces de influir sobre crecimiento, desarrollo, reproducción y viabilidad de la plaga de coleópteros que se alimentan.

La entrega *in planta* de dsARN, siARN o miARN correspondiente a genes diana y la subsiguiente ingesta por la plaga de coleópteros por medio de su alimentación tiene como resultado la regulación descendente en el coleóptero de plaga por medio del silenciamiento del gen mediado por ARN. Cuando la función de un gen diana es importante en una o más etapas del desarrollo, el crecimiento, desarrollo y reproducción de la plaga de coleópteros son afectados, y por lo menos en el caso de uno de los siguientes: WCR, NCR, SCR, MCR, *D. balteata* LeConte, *D. u. tenella*, *D. speciosa* Germar, y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim, conduce a la imposibilidad de infestar con éxito, alimentarse, desarrollarse y/o reproducirse, o conduce a la muerte de la plaga de coleópteros. La elección de los genes diana y la aplicación exitosa del ARNi se utiliza por lo tanto para controlar la plaga de coleópteros.

Comparación fenotípica de líneas de ARNi transgénicas con *Zea mays* no transformado. Los genes de los coleópteros de plaga diana o las secuencias seleccionadas para crear dsARN de horquilla dsARN no tienen ninguna similitud con ninguna secuencia de genes de planta conocida. Por lo tanto no cabe prever que la producción o activación de ARNi (sistémica) por constructos que apuntan a estos genes de plaga de coleópteros o a sus secuencias, tenga algún efecto perjudicial sobre las plantas transgénicas. Sin embargo, se comparan las características de desarrollo y morfológicas de líneas transgénicas con plantas no transformadas, como también aquellas de líneas transgénicas que han sido transformadas con un vector

“vacío” que no tenga ningún centro que exprese de horquilla. Se comparan las características de raíces de las plantas, brotes, follaje y de reproducción. No hay una diferencia observable en cuanto longitud de raíces ni en los patrones de crecimiento de las plantas transgénicas y no transformadas. Las características de los brotes de las plantas, tales como altura, número y tamaño de las hojas, momento y aspecto de la floración, son similares. En términos generales no hay diferencias morfológicas observables entre las líneas transgénicas y aquellas sin la expresión de moléculas de ARNi diana cuando se cultivan *in vitro* y en el suelo en el invernadero.

Ejemplo 14: *Zea mays* transgénico que comprende una secuencia de plaga de coleópteros y constructos de ARNi adicionales

Una planta transgénica de *Zea mays* que comprende una secuencia de codificación heteróloga en su genoma que es transcrita en una molécula de iARN que apunta a un organismo distinto de una plaga de coleópteros es transformada secundariamente por medio de metodologías de *Agrobacterium* o WHISKERS™ (Véase Petolino y Arnold (2009) *Methods Mol. Biol.* 526:59-67) para producir una o más moléculas de dsARN insecticida (por ejemplo, por lo menos una molécula de dsARN que incluye una molécula de dsARN que apunta a un gen que comprende la SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 3 o SEC ID NO: 67). Los vectores plásmido de transformación de planta preparados esencialmente como se describe en el EJEMPLO 7 son entregados mediante métodos de transformación mediados por *Agrobacterium* o WHISKERS™-en células de suspensión de maíz o

en embriones de maíz inmaduros obtenidos de una planta transgénica Hi II o B104 de *Zea mays* que comprende una secuencia de codificación genómica en su genoma que es transcripta en una molécula de iARN que apunta a un organismo distinto de la plaga de coleópteros.

Ejemplo 15: *Zea mays* transgénico que comprende un constructo de ARNi y secuencias del control de plaga de coleópteros adicionales

Una planta de *Zea mays* transgénica que comprende una secuencia de codificación heteróloga en su genoma que es transcrita en una molécula de iARN que apunta a un organismo coleóptero de plaga (por ejemplo, por lo menos una molécula de dsARN que incluye una molécula de dsARN que apunta a un gen que comprende la SEC ID NO:1, SEC ID NO:2, o SEC ID NO:3), es transformada secundariamente mediante metodologías de *Agrobacterium* o WHISKERS™ (Véase Petolino y Arnold (2009) *Methods Mol. Biol.* 526:59-67) para producir una o más moléculas de proteína insecticida, por ejemplo, las proteínas insecticidas, por ejemplo, las proteínas insecticidas Cry1B, Cry1I, Cry2A, Cry3, Cry7A, Cry8, Cry9D, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43, Cry55, Cyt1A, y Cyt2C. Los vectores de plásmido de transformación de planta esencialmente preparados como se describe en el EJEMPLO 7 son entregados mediante métodos de transformación mediados por *Agrobacterium* o WHISKERS™ en células de suspensión de maíz o embriones de maíz inmaduros

oBtenidas de una planta transgénica de *Zea mays* B104 que comprende una secuencia de codificación heteróloga en su genoma que es transcrita en una molécula de iARN que apunta a un organismo coleóptero de plaga. Se obtienen plantas doblemente transformadas que producen moléculas de iARN y proteínas insecticidas para el control de las plagas de coleópteros.

Ejemplo 16: Protección contra insectos mediada por pARNi

El ARNi parental que ocasiona la mortalidad de los huevos o la pérdida de viabilidad de los huevos acarrea además beneficios adicionales en cuanto a la durabilidad a los cultivos transgénicos que utilizan el ARNi y otros mecanismos para la protección contra los insectos. Para demostrar esta utilidad se utilizó un modelo básico de dos parcelas.

Una parcela contenía una planta de cultivo transgénica que expresaba ingredientes insecticidas, y la segunda parcela contenía una planta de cultivo refugio que no expresaba ingredientes insecticidas. Los huevos fueron “depositados” en las parcelas de dos modelos de acuerdo con sus proporciones relativas. En este ejemplo, la parcela transgénica representaba el 95% del paisaje, y la parcela de refugio representaba el 5%. La planta de cultivo transgénica expresaba una proteína insecticida activa contra las larvas de los gusanos de las raíces del maíz.

La resistencia de los gusanos de las raíces del maíz frente a la proteína insecticida fue modelada como monogénica, con dos alelos posibles; uno (S) que confiere una sensibilidad, y la otra (R) que

confiere una resistencia. La proteína insecticida fue modelada para ocasionar una mortalidad del 97% de las larvas de raíces de los gusanos de las raíces del maíz homocigotos sensibles (SS) que se alimentan de las raíces. Se supuso que la resistencia a la proteína insecticida es incompletamente recesiva, con lo que la dominancia funcional es de 0.3 (hay una mortalidad del 67.9% entre las larvas que son heterocigóticas (RS) en cuanto a la resistencia contra la proteína y que se alimentan de la planta de cultivo transgénica).

La planta de cultivo transgénica también expresaba dsARN parenteralmente activo, que por intermedio de la interferencia de ARN (pARNi), hace que los huevos de los gusanos de las raíces del almidón hembras adultas expuestas a la planta del cultivo transgénico, no son viables. La resistencia de los gusanos de las raíces del maíz frente al pARNi también fue considerada como monogénica con dos alelos posibles; uno (X) que confiere una sensibilidad de las hembras adultas al ARNi, y el otro (Y) que confiere una resistencia de la hembra adulta frente al ARNi. Suponiendo un elevado nivel de exposición a los dsARN, el pARNi fue remodelado para hacer que el 99,9% De los relevos producidos por una hembra homocigótica sensible (XX) sea no viable. El modelo suponía que el pARNi no tiene ningún efecto sobre la viabilidad de los huevos producidos por las hembras homocigóticas resistentes (YY). Se supuso que la resistencia al dsARN era recesiva, con lo que la dominancia funcional es del 0.01 (el 98.9% de los huevos producidos por una hembra que es heterocigótica (XY) en cuanto a la

resistencia al dsARN, no son viables).

En el modelo, hubo un apareamiento aleatorio entre los adultos sobrevivientes y una oviposición aleatoria a través de ambas parcelas de acuerdo con sus proporciones relativas. Las frecuencias genotípicas de la descendencia viable siguieron la genética mendeliana para un sistema de dos loci.

El efecto del pARNi requería que las hembras adultas se alimentasen de tejido de planta que expresa dsARN parental activo. La interferencia con el desarrollo de los huevos para hembras adultas que emergen de la planta de cultivo de refugio puede ser menor que para la planta de cultivo transgénica; se prevé que los ejemplares adultos de los gusanos de las raíces del maíz se alimentarán más ampliamente en la parcela de la que han emergido después de su desarrollo larvario. Por ello, la magnitud relativa del efecto de pARNi sobre las hembras adultas de los gusanos de las raíces del maíz que emergen de la parcela de refugio era variada; la proporción del efecto del pARNi variable entre 0 (sin efectos del pARNi sobre hembras adultas emergentes de la parcela de refugio) a 1 (el mismo efecto del pARNi sobre hembras adultas que emergen de la parcela de refugio que sobre hembras adultas que emergen de la parcela transgénica).

Este modelo podría ajustarse fácilmente para demostrar la situación en la que el efecto del pARNi también se logra, o como alternativa es posible, alimentando machos adultos con tejido de planta que expresa dsARN parental activo.

Se calcularon las frecuencias de los dos alelos de resistencia a través de generaciones. Se supuso que las frecuencias iniciales de ambos alelos de resistencia (R e Y) eran de 0.005. Los resultados se presentaron como el número de generaciones de insectos para que las frecuencias de cada uno de los alelos de resistencia llegasen a 0,05. Para examinar el retardo de la resistencia causado por el pARNi, las simulaciones que incluían pARNi fueron comparadas con simulaciones que no incluían pARNi, pero que por lo demás eran idénticas en todos los otros aspectos. Figura 6.

También se modificó el modelo para incluir el dsARN de interferencia activo en las larvas de los gusanos de las raíces del maíz en combinación con la proteína insecticida activa contra el gusano de las raíces del maíz en la planta de cultivo transgénica. Al respecto, al ARNi larval se le asignó un efecto de 97% de mortalidad larval para las larvas de los gusanos de las raíces del maíz homocigóticas sensibles al ARNi (genotipo XX), y ningún efecto sobre las larvas de las raíces del maíz que eran resistentes al ARNi homocigóticas (YY). Hubo una mortalidad del 67,9% entre las larvas del gusano de las raíces del maíz que eran heterocigóticas en cuanto a la resistencia al ARNi (XY). Se supuso que regía el mismo mecanismo de resistencia para los gusanos de las raíces del maíz de ARNi y para el pARNi activo en las larvas. Lo mismo que anteriormente, el efecto del pARNi sobre las hembras adultas que emergen de la parcela de refugio en comparación con el efecto sobre las hembras adultas que emergen de la parcela transgénica variaba

de 0 a 1. Lo mismo que anteriormente, para estudiar el retardo de la resistencia causado por el pARNi, las simulaciones que incluían pARNi fueron comparadas con simulaciones que no incluían pARNi, pero que por lo demás eran idénticas en todos los otros aspectos (inclusive el ARNi larval). Figura 7.

Se observó un manifiesto beneficio del pARNi en el control de la resistencia cuando la magnitud del efecto del pARNi sobre la viabilidad de los huevos para los adultos hembra del gusano de las raíces del maíz que emergían de la parcela de refugio se redujo en comparación con la magnitud del efecto para los adultos que emergen de la parcela transgénica. Las plantas de cultivo transgénicas que produjeron dsARN parental activo en adición a una proteína insecticida fueron mucho más duraderas en comparación con las plantas de cultivo transgénicas que producían solamente una proteína insecticida. De manera similar, las plantas de cultivo transgénicas que produjeron dsARN parental activo además de tanto una proteína insecticida como un dsARN activo contra las larvas fueron mucho más duraderas en comparación con las plantas de cultivo transgénicas que produjeron solamente una proteína insecticida y dsARNi activo contra las larvas. En este último caso, el beneficio de la durabilidad regía tanto para la proteína insecticida como para el sARN de interferencia insecticida.

Ejemplo 17: Efectos del ARNi parental sobre WCR macho

Unos WCR macho recién emergidas (CROP CHARACTERISTICS; Farmington, MN) fueron expuestos a dieta

artificial tratada con dsARN para pARNi (*hunchback*) durante 7 días con alimentación continua con dsARN. Los machos sobrevivientes fueron seguidamente apareados con hembras vírgenes y se le permitió aparearse durante 4 días. Las hembras fueron aisladas en
 5 cámaras de oviposición y se las mantuvo con dieta sin tratar a efectos de determinar si el apareamiento tuvo éxito, sobre la base de la viabilidad de los huevos. Además, las hembras fueron disecadas a efectos de determinar la presencia de espermátóforos después de 10 días de la oviposición. Se incluyeron controles de GFP dsARN y de
 10 agua.

Se llevaron a cabo tres replicados de 10 machos y 10 hembras por tratamiento por replicación. Los replicados fueron completados con adultos recién emergidos en tres días diferentes. Cada tratamiento por replicado contenía 10 machos por tratamiento por replicación, y fueron colocados en una cavidad de una bandeja. Cada
 15 cavidad incluía 12 tarugos de dieta tratados con agua o dsARN (GFP (SEC ID NO:9) o *hunchback* (SEC ID NO:3)). Cada tarugo de dieta fue tratado con 2 µg de dsARN en 3 µl. Las bandejas fueron transferidas a una cámara de cría con una temperatura de $23\pm1^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa >80%, y L:D 16:8. Los machos fueron transferidos a nuevas
 20 bandejas con 12 tarugos de dieta tratadas en cada cavidad en los días 3, 5, y 7. En el día 7, tres machos por replicación por tratamiento fueron congelados instantáneamente para el análisis por qPCR como se describe en el Ejemplo 7. En el día 8, 10 hembras y
 25 10 machos tratados fueron colocados juntos en un contenedor, a

efectos de permitir el apareamiento. Cada contenedor incluía 22 tarugos de dietas sin tratar. Los insectos fueron transferidos a nuevas bandejas con 22 tarugos de dieta sin tratar en el día 10, y los machos fueron removidos en el día 12, y se los utilizó para medir la viabilidad del esperma para lo cual se utilizaron técnicas de tinción fluorescente. Las hembras fueron transferidas a una nueva bandeja con 12 tarugos de dieta sin tratar cada dos días hasta el día 22. En el día 16, las hembras fueron transferidas a jaulas para huevos que contenían suelo que había sido procesado por autoclave, para la oviposición. En el día 22, todas las hembras fueron removidas de las jaulas de suelo y se las congeló a efectos de verificar la presencia de espermatozoides. Las jaulas con los suelos fueron transferidas a una nueva cámara de cría con una temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa superior al 80%, y 24 horas de oscuridad. En el día 28, se lavó al suelo mediante una criba #60 para recolectar los huevos de cada jaula. Los huevos fueron tratados con una solución de formaldehído (500 μl de formaldehído en 5 ml de agua dos veces destilada) y metil-(butilcarbamoil)-2-bencimidazol carbamato (0.025 g en 50 ml de agua dos veces destilada) A efecto de impedir la contaminación fúngica y se los colocó en pequeño platos de Petri que contenían papel filtro. Se tomaron fotografías de cada plato de Petri para contar los huevos, para lo cual se utilizó una función contadora de células del software ImageJ Software (Schneider *et al.* (2012) Nat. Methods 9:671-5). Los datos de Petri con los huevos fueron transferidos a una pequeña cámara de cría con una

temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa superior al 80%, y 14 horas de oscuridad. A partir de los días 29-42 se supervisó diariamente la eclosión de las larvas.

Viabilidad del esperma. Unos machos vírgenes de la especie de gusano occidental de las raíces del maíz fueron expuestos a una
5 dieta artificial tratada con ARN durante 7 días con el gen *hunchback* de ARNi parental. La dieta tratada fue provista cada dos días. Cuatro machos por tratamiento por replicaciones fueron utilizados para establecer la viabilidad del esperma para lo cual se utilizó una
10 técnica fluorescente a efectos de discriminar entre esperma vivo y esperma muerto como se describe en: Collins y Donoghue (1999). El kit Live Dead Sperm Viability Kit™ (Life Technologies, Carlsbad CA) contiene SYBR 14, una cepa de ácido nucleico que permea por la membrana, y yoduro de propidio, que tiñe las células muertas.

15 Unos WCR macho fueron anestesiados sobre hielo, se disecaron sus testículos y vesículas seminales, se los colocó en 10 μl de tampón (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, BSA 10%, pH 7,4,) y se los molió con escarbadientes pasado por autoclave. La viabilidad del esperma fue evaluada de inmediato mediante el kit Live Dead Sperm
20 Viability Kit™. 1 μl de SYBR 14 (0,1 mM en DMSO) fue añadido, y se sometió a incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido por 1 μl de yoduro de propidio (2,4 mM) y se sometió nuevamente a incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. 10 μl de solución de esperma teñido fueron transferidos a
25 un microslide de vidrio y cubiertos con una tapa slipcover. Las

muestras fueron evaluadas mediante un microscopio Nikon™ Eclipse 90i con un Nikon A1 confocal y software NIS-Elements. Las muestras fueron visualizadas a 10X con una excitación de 488, un pase de banda de 500-550 nm para esperma vivo (SYBR 14) y un pase de banda de 663-738 nm para esperma muerto (yoduro de propidio) simultáneamente. Se registraron imágenes digitales para cinco campos de vista por muestra. La cantidad de esperma vivo (verde) y de esperma muerto (rojo) fue evaluada mediante la función contador de células del software de Image, J. Schneider *et al.* (2012) Nat. Methods 9:671-5.

Los machos alimentados con *hunchback* dsARN durante 7 días proveyeron una cantidad menor de esperma total y menos esperma muerto que los machos que habían ingerido GFP dsARN o agua solamente. Tabla 20. El número promedio de esperma vivo no era significativamente diferente entre los tratamientos. No hubo una diferencia estadística en el número de huevos por hembra o eclosión porcentual de los huevos de hembras que se habían apareado con machos que habían ingerido tratamientos con dsARN. Tabla 21. No hubo una diferencia estadística en la expresión de transcritos para machos que habían sido expuestos cuatro veces a *hunchback* dsARN.

Tabla 20. Efecto del *hunchback* dsARN sobre la producción de esperma en los machos adultos de WCR y sobre la viabilidad después de 7 días de ingesta de dieta artificial tratada. Los valores medios fueron separados mediante el test de Dunnett.

Tratamiento	Valor promedio de esperma muerto $\pm$ SEM†	Valor promedio de esperma vivo $\pm$ SEM†	Valor promedio total de esperma $\pm$ SEM†
<i>hunchback</i>	60.71 $\pm$ 11.36 **	121.19 $\pm$ 25.64	181.38 $\pm$ 24.78*
<i>GFP</i>	74.79 $\pm$ 14.17*	222.74 $\pm$ 38.88	288.73 $\pm$ 43.18**
Agua	68.5 $\pm$ 12.26	164.7 $\pm$ 31.87	233.2 $\pm$ 22.34

† SEM - Error Estándar de la Media

* Indica significarse con un valor de $p < 0,1$.

** Indica significancia con un valor de $p < 0,05$.

10 Tabla 21. Efecto de *hunchback* dsARN sobre la producción de huevos de WCR y sobre la viabilidad de los huevos después de 7 días de ingesta de dieta artificial tratada con dsARN con los machos solamente.

Número de huevos por escarabajo hembra				Porcentaje de eclosión de los huevos		
	<i>hunchback</i> Reg1 dsARN	GFP dsARN	Agua	<i>hunchback</i> Reg1 dsARN	GFP dsARN	Agua
Promedio	46.96	58.08	38.52	59.41	82.93	76.24
SEM†	11.96	11.38	15.94	11.96	2.56	5.31

† SEM - Error Estándar de la Media.

20 Unos machos vírgenes fueron tratados como se describe con anterioridad con la salvedad que la exposición a dsARN se incrementó a un total de 6 veces. Los machos fueron transferidos a nuevas bandejas con 12 tarugos de dieta en cada cavidad en los días 3, 5, 7, 9, y 11. Los machos supervivientes fueron

25 seguidamente apareados con hembras vírgenes, y se les permitió

aparearse durante 4 días. Las hembras fueron aisladas en cámaras de oviposición y se las mantuvo en dieta sin tratar a efectos de determinar si el apareamiento fue exitoso sobre la base de la viabilidad de los huevos.

5 Tabla 22. Efecto de *hunchback* dsARN sobre la producción de huevos de WCR y sobre la viabilidad de los huevos después de 7 días de la ingesta de dieta artificial tratada con dsARN por los machos solamente. Los valores medios fueron separados mediante el test de Dunnett.

10

Número de huevos por escarabajo hembra				Porcentaje de huevos eclosionados		
	<i>hunchback</i> Reg1 dsARN	GFP dsARN	Agua	<i>hunchback</i> Reg1 dsARN	GFP dsARN	Agua
Promedio	55.03	47.7	64.4	33.02	34.57	34.82
SEM†	12.2	6.35	12.29	16.25	12.98	12.06

15

† SEM - Error Estándar de la Media.

La expresión relativa en los machos fue determinada como se describe en el Ejemplo 7.

20

Tabla 23. Expresión relativa de *hunchback* en machos adultos expuestos 6 veces a *hunchback* dsARN en dieta artificial tratada en comparación con controles de GFP y de agua. Hay una reducción en los niveles de transcritos en los machos adultos. Los valores medios fueron separados mediante el test de Dunnett.

25

Tratamiento	Expresión relativa	SEM†	Valor de p
<i>hunchback</i>	0.377	0.058	0.0017*
GFP	0.960	0.092	0.565
Agua	1.096	0.192	

5 † SEM- Error Estándar de la Media.

* indica una significancia a $p < 0,05$.

EJEMPLO 18: Concentración efectiva

Unas hembras apareadas fueron expuestas a cuatro condiciones de exposición de *hunchback* dsARN a efectos de

10 determinar las concentraciones efectivas. Unos machos y hembras recién emergidos (<48 horas) fueron provistos por CROP CHARACTERISTICS (Farmington, MN). Los tratamientos incluían 2, 0.2, 0.02, y 0.002 μg de *hunchback* (SEC ID NO:3) dsARN por tarugo de dieta. El GFP a razón de 2 μg y agua sirvieron como controles.

15 Diez machos y 10 hembras fueron colocados en una cavidad que contenía 20 pellas de dieta artificial sin tratar. Las bandejas fueron transferidos a una cámara de cría y se las mantuvo a una temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad relativa y $>80\%$, y fotoperíodo de 16:8. Los machos fueron retirados del experimento en el día 5. Se

20 proveyó dieta artificial fresca cada dos días hasta el día 13. En el día 14 las hembras fueron transferidas a jaulas de huevos que contenían suelo tratado por autoclave, y se promedió dieta artificial tratada nueva (a razón de 1 tarugos por jaula). Las jaulas de huevos fueron colocadas nuevamente en la cámara de cría.

25 En el día 6 se proveyó dieta tratada nueva como se describe con

anterioridad. Todas las hembras fueron retiradas de las jaulas de suelo en el día 18, y se las congeló instantáneamente para el qPCR. Las jaulas de suelo fueron transferidas a una nueva cámara de cría con una temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa $>80\%$ y 24 horas de oscuridad. En el día 24, se lavó el suelo mediante una criba #60 a efectos de recolectar los huevos de cada jaula. Los huevos fueron tratados con una solución de formaldehído (500 μl de formaldehído en 5 ml de agua dos veces destilada) y metil-(buticarbamoil)-2-bencimidazol carbamato (0.025 g en 50 ml de agua dos veces destilada) a efectos de prevenir la contaminación fúngica y se colocaron en pequeños platos de Petri que contenían papel filtro. Se tomaron fotografías de cada plato de Petri para el recuento de huevos para lo cual se utilizó la función contadora de células del software ImageJ Software (Schneider *et al.* (2012) Nat. Methods 9:671-5). Los platos de Petri con huevos fueron transferidos a una pequeña cámara de cría con una temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa $>80\%$, y 24 horas de oscuridad. La eclosión de las larvas fue supervisada diariamente durante 15 días. Las larvas fueron contadas y retiradas del plato de Petri cada día.

Hubo una eclosión significativamente reducida de huevos con el tratamiento de tarugo a razón de 2 y 0,2 $\mu\text{g}/\text{dieta}$ (Tabla 24), pero no hubo una diferencia significativa en el número de huevos depositados por hembra entre ninguna de las dosis ensayadas y los controles.

Tabla 24. Efecto de las concentraciones de *hunchback* dsARN sobre la producción de los huevos de WCR y sobre la viabilidad de

los huevos después de la ingesta de dieta artificial tratada. Los valores medios fueron separados mediante el test de Dunnett.

Tratamiento	Dosis (µg)	Número de huevos por escarabajo hembra		Porcentaje de eclosión de los huevos	
		Promedio	SEM*	Promedio	SEM*
<i>hunchback</i> Reg1 dsARN	2	98.16 (A)	13.51	0.11 (B)	0.11
<i>hunchback</i> Reg1 dsARN	0.2	63.82 (A)	22.82	2.26 (B)	0.99
<i>hunchback</i> Reg1 dsARN	0.02	96.08 (A)	7.91	35.37 (A)	4.46
<i>hunchback</i> Reg1 dsARN	0.002	76.13 (A)	16.71	39.27 (A)	9.54
GFP dsARN	2	64.87 (A)	28.64	32.58 (A)	10
Agua	0	70.71 (A)	20.18	39.41 (A)	3.92

*SEM- Error Estándar de la Media. Las letras entre paréntesis designan niveles estadísticos. Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La expresión relativa de *hunchback* a partir de hembras de *D. v. virgífera* tratadas con concentraciones de 2, 0,2, y 0,02 fueron significativamente inferiores a los controles (agua y GFP) (Figura 11). Las comparaciones fueron efectuadas con el test de Dunnett.

EJEMPLO 19: programación de la exposición

Unas hembras fueron expuestas 6 veces a 2 µg *hunchback* dsARN empezándose en tres tiempos diferente a efecto de determinar el momento de la exposición necesaria para generar un efecto de ARNi parental. Las hembras fueron expuestas a dsARN 6

veces antes del apareamiento, 6 veces inmediatamente después del apareamiento, y a los 6 días después del apareamiento. Para cada momento de exposición se completaron tres replicaciones de 10 hembras y 10 machos por replicación. Los WCR adultos fueron provistos por CROP CHARACTERISTICS (Farmington, MN).

Alimentación con dsARN antes del apareamiento. Se colocaron primero hembras en una cavidad con 11 pellas de dieta artificial tratada (2 µg de dsARN por pella). Las bandejas fueron transferidas a una cámara de cría con una temperatura de $23\pm1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa >80%, y un fotoperíodo de 16:8 L:D. Las hembras fueron transferidas a bandejas que contenían dieta tratada fresca cada dos días durante 10 días. En el día 12, las hembras fueron apareadas con 10 machos, y se proveyeron 22 tarugos de dieta artificial no tratada. Los machos fueron retirados después de cuatro días. Se proveyó dieta sin tratar fresca cada dos días durante 8 días. En el día 22, las hembras fueron transferidas a jaulas de huevos que contenían suelo tratado en autoclave junto con 11 tarugos de dieta artificial sin tratar. Las jaulas de huevos fueron colocadas de regreso en la cámara de cría y se reemplazó la dieta en el día 24. En el día 26, las hembras fueron retiradas de las jaulas de suelo y congeladas instantáneamente para efectuar el qPCR.

Las jaulas de suelo fueron transferidas a una cámara de cría a temperatura de $27\pm1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa >80%, y 24 horas de oscuridad. Después de 4 días, se lavó el suelo utilizando una criba # 60 para recolectar los huevos de cada jaula. Los huevos fueron

tratados con una solución de formaldehído (500 μ l de formaldehído en 5 ml de agua dos veces destilada) y carbamato de metil-(buticarbamoíl)-2-bencimidazol (0,025 g en 50 ml de agua dos veces destilada) a efectos de prevenir la contaminación fúngica y se

5 colocaron en pequeños platos de Petri que contenían papel filtro. Se tomaron fotografías de cada plato de Petri para el recuento de huevos por lo cual se utilizó la función contadora de células del software ImageJ. Los platos de Petri con huevos fueron transferidos a una pequeña cámara de cría con una temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$,

10 humedad relativa $>80\%$, y 24 horas de oscuridad. La eclosión larval fue supervisada diariamente durante 15 días. Las larvas fueron contadas y retiradas del plato de Petri cada día. La Figura 8A ilustra una síntesis de datos que muestra el número de huevos recuperados por hembra, y la Figura 8B ilustra los resultados del porcentaje total de larvas que eclosionaron, respectivamente. Después de una

15 exposición a $0.67 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *hunchback* o GFP seis veces antes de aparearse, 6 veces inmediatamente después de aparearse, y a los 6 días después de aparearse. Las comparaciones fueron llevadas a cabo con el test de Dunnett, * indica una significancia a $p < 0.1$, **

20 indica una significancia a $p < 0.05$, *** indica una significancia a $p < 0.001$. La Figura 9 ilustra un resumen de datos que muestra la expresión relativa de *hunchback* medida después de una exposición a $0.67 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *hunchback* o de GFP seis veces antes de aparearse, 6 veces inmediatamente después de aparearse, y 6 veces a los 6

25 días después de aparearse. Las comparaciones fueron llevadas a

cabo con el test de Dunnett, ** indica una significancia a $p < 0.05$, *** indica una significancia a $p < 0.001$.

Alimentación con dsARN inmediatamente después de aparearse. Se utilizaron métodos similares a los anteriormente descritos con la salvedad de 10 machos y 10 hembras fueron colocados juntos en una cavidad con 22 pellas de dieta artificial sin tratar al inicio del estudio. Las bandejas fueron transferidas a una cámara de cría como se describió anteriormente. Se proveyó dieta sin tratar fresca en el día 3 y los machos fueron retirados en el día 5. Las hembras fueron seguidamente transferidas a dieta artificial tratada y se las mantuvo en la cámara de cría. Se proveyó dieta tratada fresca una vez cada dos días durante 6 días. En el día 12, las hembras fueron transferidas a jaulas de huevos que contenían suelo tratado en autoclave junto con 11 tarugos de dieta artificial tratada. Las jaulas de huevos fueron colocadas de regreso en la cámara de cría y se proveyó dieta tratada fresca en el día 14. En el día 16, todas las hembras fueron retiradas de las jaulas de suelo y se las congeló instantáneamente para llevar a cabo el qPCR. Se llevó a cabo el lavado de las jaulas del suelo y de los huevos después de 6 días como se describió anteriormente. Se tomaron fotografías de cada plato de Petri para el recuento de huevos. La eclosión larval fue supervisada diariamente durante 15 días. En la Figura 8A se muestran los resultados de huevos por hembra y en la Figura 8B se muestran los resultados del porcentaje total de larvas que eclosionaron. Se midió la expresión relativa de *hunchback* en las

hembras después de recibir 6 veces dsARN, y los resultados se muestran en la Figura 9.

Alimentación con dsARN después de aparearse. Se siguieron métodos similares a los descritos anteriormente para la alimentación con dsARN. Inmediatamente después del apareamiento, con la excepción de los insectos recibieron dieta artificial sin tratar cada dos días hasta el día 11, cuando las hembras fueron transferidas a dieta tratada. En el día 12, las hembras fueron transferidas a jaulas de huevos que contenían suelo tratado en autoclave junto con 11 tarugos de dieta artificial tratada. Las jaulas de huevos fueron colocadas de regreso en la cámara de cría. Se proveyó dieta tratada fresca cada dos días a partir de los días 12-20. En el día 22, todas las hembras fueron retiradas de las jaulas de suelo y se las congeló instantáneamente para llevar a cabo el qPCR. Se llevó a cabo el lavado de las jaulas del suelo y de los huevos después de 6 días como se describió anteriormente. Se tomaron fotografías de cada plato de Petri para el recuento de huevos. En la Figura 8A se muestran los resultados de huevos por hembra y en la Figura 8B se muestran los resultados del porcentaje total de larvas que eclosionaron. Se midió la expresión relativa de *hunchback*, y los resultados se muestran en la Figura 9.

La mortalidad de las hembras fue registrada una vez cada dos días durante la totalidad de los tratamientos a lo largo del estudio.

EJEMPLO 20: Duración de la exposición

Unos machos y hembra vírgenes fueron apareados durante un

período de 4 días después de lo cual las hembras fueron expuestas a
 2 μ g de *hunchback* dsARN. Para evaluar la duración de la
 exposición, los insectos fueron expuestos a *hunchback* o GFP dsARN
 1, 2, 4 ó 6 veces (lo que se muestra como T₁, T₂, T₄ o T₆ en las
 5 Figuras 10 y 10B). Se completaron cuatro replicaciones de 10
 hembras y 10 machos por tratamiento. Los machos y hembras
 adultos fueron provistos por CROP CHARACTERISTICS (Farmington,
 MN). Diez machos y 10 hembras fueron colocados juntos en una
 cavidad con 20 pellas de dieta artificial sin tratar. Las bandejas
 10 fueron mantenidas en una cámara de cría con una temperatura de
 23±1°C, humedad relativa >80%, y un fotoperíodo de 16:8 L:D. Se
 proveyó dieta artificial sin tratar nueva en el día 3. Los machos
 fueron retirados en el día 5, las hembras fueron transferidas a una
 nueva bandeja que contenía 11 tarugos de dieta por cavidad con el
 15 respectivo tratamiento. En el día 7, las hembras fueron transferidas a
 bandejas compuesto intermedio dieta artificial nueva, y se registró la
 mortalidad. Las hembras desde el momento de exposición (T₁) fueron
 transferidas a dieta sin tratar. En los días 10 y 12, las hembras
 fueron transferidas a nuevas bandejas con dieta artificial tratado
 20 nueva, y se registró su mortalidad. Las hembras desde T₁ y T₂ fueron
 transferidas a dieta sin tratar. En el día 14, las hembras fueron
 transferidas a jaulas de huevos que contenían suelo que había sido
 sometido a autoclave, se proveyó nueva dieta artificial tratada. Las
 hembras desde T₁, T₂, y T₄ recibieron dieta sin tratar. En el día 16,
 25 se retiró la dieta antigua y se añadió nueva dieta tratada. Las

hembras a partir de T_1 , T_2 , y T_4 recibieron dieta sin tratar. Después de 18 días, todas las hembras fueron retiradas de las jaulas de suelo y congeladas instantáneamente para efectuar el qPCR. Las jaulas de suelo fueron transferidas a una cámara de cría con una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad relativa $>80\%$ y 24 horas de oscuridad. Se lavaron los huevos y se tomaron fotografías de cada plato de Petri de acuerdo al indicado para la programación de la exposición. Se contaron las larvas eclosionadas y si la retiró de cada plato de Petri cada día a lo largo de 15 días. En la Figura 10A se muestran los resultados del porcentaje de huevos ovipositados por hembra. En la Figura 10B se muestran los resultados del porcentaje total de larvas eclosionadas. Se midió la expresión relativa de *hunchback*, y los resultados se muestran en la Figura 10C.

EJEMPLO 21: Desarrollo ovárico

Se evaluó el desarrollo ovárico de *D. v. virgífera* en hembras que habían sido expuestas a dieta artificial tratada con *hunchback* dsARN antes de aparearse e inmediatamente después de aparearse de acuerdo con lo descrito para la programación de la exposición. Las hembras fueron expuestas a 2 μg de *hunchback* o de GFP dsARN, o a agua 6 veces. Se recolectaron cinco hembras por tratamiento un día después de la última exposición a dsARN y se guardaron en etanol al 70% para disecciones ováricas subsiguientes. Las disecciones de ovarios para todas las hembras sobrevivientes fueron llevadas a cabo bajo un estereomicroscopio. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Olympus SZX16, lente

Olympus SDF PLAPO 2X PFC y software Olympus CellSens Dimensions software (Tokio, Japón).

Las disecciones efectuadas en *D. v. virgífera* no revelaron diferencias aparentes en cuanto al desarrollo ovárico entre hembras
5 tratadas con agua, GFP o *hunchback* dsARN; esto se cumplía también para las hembras no apareadas como también para aquellas disecadas inmediatamente después de aparearse.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que comprende al menos un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 SEC ID NO:1; el complemento de SEC ID NO:1; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC ID NO:1; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC ID NO:1; una secuencia codificadora nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:1; el complemento de
- 10 una secuencia codificadora nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:1; una secuencia no codificadora nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende la SEC ID NO:1; el complemento de una secuencia no codificadora nativa de un organismo de *Diabrotica* que
- 15 se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende la SEC ID NO:1; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificadora nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:1; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificadora
- 20 nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende la SEC ID NO:1; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificadora nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende la SEC ID NO:1; y el complemento de un fragmento de al menos 15
- 25 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificadora nativa de un

organismo de *Diabrotica* que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende la SEC ID NO:1,

en donde el polinucleótido está ligado operativamente a un promotor heterólogo.

5 2. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en la SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:46 y SEC ID NO:67.

3. Un vector de transformación de planta que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1.

10 4. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el organismo se selecciona del grupo que consiste en *D. v. virgifera* LeConte; *D. barberi* Smith y Lawrence; *D. u. howardi*; *D. v. zaeae*; *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. speciosa* Germar; y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim.

15 5. Una molécula de ácido ribonucleico (ARN, por sus siglas en inglés) transcrita del polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1.

6. Una molécula de ácido ribonucleico de cadena doble producida a partir de la expresión del polinucleótido de acuerdo con
20 la reivindicación 1.

7. La molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el contacto de la secuencia de polinucleótidos con una plaga de coleópteros inhibe la expresión de una secuencia de nucleótidos endógena
25 específicamente complementaria con el polinucleótido.

8. La molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el contacto de dicha molécula de ribonucleótido con una plaga de coleópteros mata o inhibe el crecimiento, reproducción y/o alimentación de la plaga.

5 9. El ARN de cadena doble de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende un primer, un segundo y un tercer segmento de ARN, en donde el primer segmento de ARN comprende el polinucleótido, en donde el tercer segmento de ARN se une al primer segmento de ARN mediante la segunda secuencia de polinucleótidos,
10 y donde el tercer segmento de ARN es sustancialmente el complemento inverso del primer segmento de ARN, de modo que el primer y el tercer segmentos de ARN se hibridan cuando se transcriben en un ácido ribonucleico para formar el ARN de cadena doble.

15 10. El ARN de acuerdo con la reivindicación 5, seleccionado del grupo que consiste en una molécula de ácido ribonucleico de cadena doble y una molécula de ácido ribonucleico de cadena simple de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud.

20 11. Un vector de transformación de planta que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el promotor heterólogo es funcional en una célula de planta.

12. Una célula transformada con el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1.

25 13. La célula de acuerdo con la reivindicación 12, en donde

la célula es una célula procariótica.

14. La célula de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la célula es una célula eucariótica.

15. La célula de acuerdo con la reivindicación 14, en donde
5 la célula es una célula de planta.

16. Una planta transformada con el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1.

17. Una semilla de la planta de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la semilla comprende el polinucleótido.

10 18. Un producto básico producido a partir de la planta de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el producto básico comprende una cantidad detectable del polinucleótido.

19. La planta de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el al menos un polinucleótido se expresa en la planta como una
15 molécula de ácido ribonucleico de cadena doble.

20. La célula de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la célula es una célula de *Zea mays*.

21. La planta de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la planta es *Zea mays*.

20 22. La planta de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el al menos un polinucleótido se expresa en la planta como una molécula de ácido ribonucleico, y la molécula de ácido ribonucleico inhibe la expresión de un polinucleótido endógeno que es específicamente complementario con al menos un polinucleótido
25 cuando una plaga de coleópteros ingiere una parte de la planta.

23. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende al menos un polinucleótido adicional que codifica una molécula de ARN que inhibe la expresión de un gen de la plaga endógeno.

5 24. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el polinucleótido adicional codifica una molécula de ARNi que produce un fenotipo de ARNi parental.

25. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el polinucleótido adicional codifica una molécula de ARNi que
10 inhibe la expresión de un gen *hunchback* o *kruppel*.

26. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el polinucleótido adicional codifica una molécula de ARNi que produce disminución del crecimiento y/o desarrollo y/o mortalidad en una plaga de coleópteros que se pone en contacto con la molécula
15 de ARNi (ARNi letal).

27. Un vector de transformación de planta que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 23, en donde los polinucleótidos adicionales están unidos operativamente a un promotor heterólogo funcional en una célula de planta.

20 28. Un método para controlar una población de la plaga de coleópteros, el método que comprende proporcionar un agente que comprende una molécula de ácido ribonucleico (ARN, por sus siglas en inglés) que actúa después del contacto con la plaga de coleópteros para inhibir una función biológica dentro de la plaga de
25 coleópteros, en donde el ARN se puede hibridar específicamente con

un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en cualquiera de las SEC ID NOs:70-73; el complemento de cualquiera de las SEC ID NOs:70-73; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC ID NOs:70-73; el complemento de un
5 fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC ID NOs:70-73; un transcripto de cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3 y 67; el complemento de un transcripto de cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3 y 67; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un transcripto de cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3 y
10 67; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un transcripto de cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3 y 67.

29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el agente es una molécula de ARN de cadena doble.

15 30. Un método para controlar una población de la plaga de coleópteros, el método que comprende:

introducir en una plaga de coleópteros, una molécula de ácido ribonucleico (ARN, por sus siglas en inglés) que actúa después del contacto con la plaga de coleópteros para inhibir una función
20 biológica dentro de la plaga de coleópteros, en donde el ARN se puede hibridar específicamente con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en cualquiera de las SEC ID NOs:70-73,

el complemento de cualquiera de las SEC ID NOs:70-73,

un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de
25 cualquiera de las SEC ID NOs:70-73,

el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC ID NOs:70-73,

un transcripto de cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3, y 67,

el complemento de un transcripto de cualquiera de las SEC ID
5 NOs:1, 3, y 67,

un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un transcripto de cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3, y 67, y

el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un transcripto de cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3, y
10 67,

de este modo se produce una plaga de coleópteros que tiene un fenotipo pARNi.

31. El método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el ARN se introduce en una plaga de coleópteros macho.

15 32. El método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el ARN se introduce en una plaga de coleópteros hembra, el método que además comprende liberar la plaga de coleópteros hembra que tiene el fenotipo pARNi en la población de plaga, en donde el apareamiento entre la plaga de coleópteros hembra que tiene el
20 fenotipo pARNi y las plagas macho de la población produce menos crías viables que el apareamiento entre otras plagas hembra y plagas macho de la población.

33. Un método para controlar una población de la plaga de coleópteros, el método que comprende:

25 proporcionar un agente que comprende una primera y una

segunda secuencia de polinucleótidos que actúa después del contacto con la plaga de coleópteros para inhibir una función biológica dentro de la plaga de coleópteros, en donde la primera secuencia de polinucleótidos comprende una región que exhibe de
5 aproximadamente 90% a aproximadamente 100% de identidad de secuencia con de aproximadamente 19 a aproximadamente 30 nucleótidos contiguos de la SEC ID NO:70, y en donde la primera secuencia de polinucleótidos se hibrida específicamente con la segunda secuencia de polinucleótidos.

10 34. El método de acuerdo con la reivindicación 33, en donde la molécula de ácido ribonucleico es una molécula de ácido ribonucleico de cadena doble.

 35. El método de acuerdo con la reivindicación 33, en donde la población de la plaga de coleópteros está reducida con respecto a
15 una población de la misma especie de plaga que infesta una planta anfitrión de la misma especie anfitrión que carece de la célula de planta transformada.

 36. Un método para controlar una población de la plaga de coleópteros, el método que comprende:

20 proporcionar en una planta anfitrión de una plaga de coleópteros una célula de planta transformada que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polinucleótido se expresa para producir una molécula de ácido ribonucleico que actúa después del contacto con una plaga de
25 coleópteros perteneciente a la población para inhibir la expresión de

una secuencia diana dentro de la plaga de coleópteros y produce
disminución de la reproducción de la plaga de coleópteros o
población de plagas, con respecto a la reproducción de la misma
especie de plaga en una planta de la misma especie de planta
5 anfitrión que no comprende el polinucleótido.

37. El método de acuerdo con la reivindicación 36, en donde
la molécula de ácido ribonucleico es una molécula de ácido
ribonucleico de cadena doble.

38. El método de acuerdo con la reivindicación 36, en donde
10 la población de la plaga de coleópteros está reducida con respecto a
una población de la plaga de coleópteros que infesta una planta
anfitrión de la misma especie que carece de la célula de planta
transformada.

39. Un método de controlar la infestación de plaga de
15 coleópteros en una planta, el método que comprende proporcionar en
la dieta de una plaga de coleópteros un ácido ribonucleico (ARN, por
sus siglas en inglés) que se puede hibridar específicamente con un
polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

SEC ID NOs:70-73,
20 el complemento de cualquiera de las SEC ID NOs:70-73,
un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de
cualquiera de las SEC ID NOs:70-73,
el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos
contiguos de cualquiera de las SEC ID NOs:70-73,
25 un transcripto de cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3, y 67,

el complemento de un transcripto de cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3, y 67,

un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un transcripto de cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3, y 67, y

5 el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un transcripto de cualquiera de las SEC ID NOs:1, 3, y 67.

40. El método de acuerdo con la reivindicación 39, en donde la dieta comprende una célula de planta transformada para expresar
10 el polinucleótido.

41. El método de acuerdo con la reivindicación 39, en donde el ARN que se puede hibridar específicamente está comprendido en una molécula de ARN de cadena doble.

42. Un método para mejorar el rendimiento de un cultivo de
15 maíz, el método que comprende:

introducir el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 en una planta de maíz para producir una planta de maíz transgénica;
y

cultivar la planta de maíz para permitir la expresión de al
20 menos un polinucleótido; donde la expresión de al menos un polinucleótido inhibe la reproducción o crecimiento de la plaga de coleópteros y pérdida de rendimiento debido a la infección de la plaga de coleópteros.

43. El método de acuerdo con la reivindicación 42, en donde
25 la expresión del al menos un polinucleótido produce una molécula de

ARN que suprime al menos un primer gen diana en una plaga de coleópteros que se ha puesto en contacto con una porción de la planta de maíz.

44. Un método para producir una célula de planta transgénica, el método que comprende:

transformar una célula de planta con un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1;

cultivar la célula de planta transformada en condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo de célula de planta que comprende una pluralidad de células de planta transformadas;

seleccionar las células de planta transformadas que han integrado el al menos un polinucleótido en sus genomas;

analizar las células de planta transformadas para la expresión de una molécula de ácido ribonucleico (ARN, por sus siglas en inglés) codificado por al menos un polinucleótido; y

seleccionar una célula de planta que expresa el ARN.

45. El método de acuerdo con la reivindicación 44, en donde la molécula de ARN es una Molécula de ARN de cadena doble.

46. Un método para proporcionar la protección contra una plaga de coleópteros a una planta transgénica, el método que comprende:

proporcionar la célula de planta transgénica producida por el método de acuerdo con la reivindicación 44; y

regenerar una planta transgénica a partir de la célula de planta

transgénica, en donde la expresión de la molécula de ácido ribonucleico codificado por al menos un polinucleótido es suficiente para modular la expresión de un gen diana en una plaga de coleópteros que se pone en contacto con la planta transformada.

5 47. Un método para producir una célula de planta transgénica, el método que comprende:

transformar una célula de planta con un vector que comprende un medio para proteger una planta de una plaga de coleópteros;

10 cultivar la célula de planta transformada en condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo de célula de planta que comprende una pluralidad de células de planta transformadas;

15 seleccionar las células de planta transformadas que han integrado el medio para proteger una planta de una plaga de coleópteros en sus genomas;

analizar las células de planta transformadas para la expresión de un medio para inhibir la expresión de un gen diana en una plaga de coleópteros; y

20 seleccionar una célula de planta que expresa el medio para inhibir la expresión de un gen diana para inhibir la expresión de un gen diana en una plaga de coleópteros.

48. Un método para producir una planta transgénica protegida de la plaga de coleópteros, el método que comprende:

25 proporcionar la célula de planta transgénica producida por el método de acuerdo con la reivindicación 47; y

regenerar una planta transgénica de la célula de planta transgénica, en donde la expresión del medio para inhibir la expresión de un gen diana en una plaga de coleópteros es suficiente para modular la expresión de un gen blanco en una plaga de coleópteros que se pone en contacto con la planta transformada.

49. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de *Bacillus thuringiensis*.

50. El ácido nucleico de reivindicación 49, en donde el polipéptido de *B. thuringiensis* se selecciona de un grupo que comprende Cry1B, Cry1I, Cry2A, Cry3, Cry7A, Cry8, Cry9D, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43, Cry55, Cyt1A, y Cyt2C.

51. La célula de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la célula comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de *Bacillus thuringiensis*.

52. La célula de acuerdo con la reivindicación 51, en donde el polipéptido de *B. thuringiensis* se selecciona de un grupo que comprende Cry1B, Cry1I, Cry2A, Cry3, Cry7A, Cry8, Cry9D, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43, Cry55, Cyt1A, y Cyt2C.

53. La planta de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la planta comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de *Bacillus thuringiensis*.

54. La planta de acuerdo con la reivindicación 53, en donde

el polipéptido de *B. thuringiensis* se selecciona de un grupo que comprende Cry1B, Cry1I, Cry2A, Cry3, Cry7A, Cry8, Cry9D, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43, Cry55, Cyt1A, y Cyt2C.

5 55. El método de acuerdo con la reivindicación 42, en donde la célula de planta transformada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de *Bacillus thuringiensis*.

 56. El método de acuerdo con la reivindicación 55, en donde el polipéptido de *B. thuringiensis* se selecciona de un grupo que
10 comprende Cry1B, Cry1I, Cry2A, Cry3, Cry7A, Cry8, Cry9D, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43, Cry55, Cyt1A, y Cyt2C.

RESUMEN

Esta descripción trata de moléculas de ácido nucleico y sus métodos de uso para controlar las plagas de coleópteros a través de la inhibición mediada por interferencia de ARN de las secuencias codificadora diana y no codificadora transcrita en las plagas de coleópteros. La descripción también trata de métodos para obtener plantas transgénicas que expresan moléculas de ácido nucleico útiles para el control de las plagas de coleópteros, y las células de plantas y plantas obtenidas de este modo.