

MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO DE ARN POLIMERASA II215 PARA EL CONTROL DE PLAGAS DE INSECTOS

REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos, núm. de serie 62/133,202, presentada el 13 de marzo de 2015, para “RNA Polymerase II215 Nucleic Acid Molecules to Control Insect Pests,” cuya descripción se incorpora en su totalidad a la presente descripción a modo de referencia.

10 CAMPO TÉCNICO

- La presente invención se refiere en general al control genético del daño en plantas causado por las plagas de insectos (por ejemplo, plagas de coleópteros y plagas de hemípteros). En modalidades particulares, la presente invención se refiere a la identificación de polinucleótidos codificantes y no codificantes objetivo, y al uso de tecnologías de ADN recombinante para reprimir o inhibir
- 15 postranscripcionalmente la expresión de los polinucleótidos codificantes y no codificantes objetivo en las células de una plaga de insectos para proporcionar un efecto protector vegetal.

ANTECEDENTES

- El gusano de la raíz del maíz occidental (WCR, *por sus siglas en inglés*), *Diabrotica virgifera*
- 20 *virgifera* LeConte, constituye una de las especies de gusanos de la raíz del maíz más devastadoras en América del Norte y motivo de preocupación particular en zonas de cultivo de maíz del medio oeste de los Estados Unidos. El gusano de la raíz del maíz del norte (NCR, *por sus siglas en inglés*), *Diabrotica barberi* Smith y Lawrence, es una especie estrechamente relacionada que cohabita gran parte del mismo rango que el WCR. Existen otras varias subespecies relacionadas de *Diabrotica* que
- 25 son plagas significativas en América: el gusano de la raíz del maíz mexicano (MCR, *por sus siglas en inglés*), *D. virgifera zea* Krysan y Smith; el gusano de la raíz del maíz del sur (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 Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos estimó que los gusanos de la raíz del maíz causan pérdidas anuales en los ingresos que
- 30 ascienden a 1 mil millones de Dólares Estadounidenses, que incluyen 800 millones de Dólares

Estadounidenses en pérdidas en el rendimiento y 200 millones de Dólares Estadounidenses en costos de tratamientos.

Los huevos del WCR y NCR se depositan en el suelo durante el verano. Los insectos permanecen en la etapa de huevo durante todo el invierno. Los huevos son oblongos, blancos y presentan una longitud inferior a 0.004 pulgadas. Las larvas nacen a fines de mayo o principios de junio, pero el tiempo preciso en el que salen del huevo varía de un año a otro debido a las diferencias de temperatura y la ubicación. Las larvas recién nacidas son gusanos blancos que tienen una longitud inferior a 0.125 pulgadas. Una vez que salen del huevo, las larvas comienzan a alimentarse de raíces del maíz. Los gusanos de la raíz del maíz atraviesan tres instares larvarios. Luego de alimentarse durante varias semanas, las larvas pasan a la etapa de pupa. Empupan en el suelo, y después emergen del suelo como adultos en julio y agosto. Los gusanos de la raíz adultos tienen una longitud de aproximadamente 0.25 pulgadas.

Las larvas del gusano de la raíz del maíz completan su desarrollo en el maíz y varias otras especies de pastos. Las larvas que se crían en cola de zorro amarilla emergen más tarde y tienen un tamaño de cápsula de cabeza más pequeño como adultos que las larvas que se alimentan con maíz. Ellsbury *et al.* (2005) Environ. Entomol. 34:627-34. Los WCR adultos se alimentan de los estigmas, el polen, y los granos de maíz en las puntas expuestas de las espigas. Si los WCR adultos emergen antes de que se hallen presentes los tejidos reproductores del maíz, pueden alimentarse del tejido de las hojas, por lo cual el crecimiento de la planta se hace más lento y ocasionalmente producen la muerte de la planta huésped. Sin embargo, los adultos cambiarán rápidamente a los estigmas y el polen preferidos cuando se hallan disponibles. Los NCR adultos también se alimentan de tejidos reproductores de la planta de maíz pero, contrariamente, rara vez se alimentan de las hojas de maíz.

La mayoría del daño causado por el gusano de la raíz en el maíz es provocado por la alimentación de las larvas. Los gusanos de la raíz recién nacidos se alimentan inicialmente de los pelos de la raíz del maíz y se meten en las puntas de las raíces. A medida que crecen las larvas, éstas se alimentan de las raíces primarias y se meten en ellas. Cuando los gusanos de la raíz del maíz son abundantes, la alimentación de las larvas resulta con frecuencia en la poda de las raíces completamente hasta la base del tallo de la planta de maíz. La lesión severa de las raíces interfiere con la capacidad de las raíces para transportar agua y nutrientes hacia la planta, reduce el crecimiento de la planta, y resulta en una menor producción de granos, por lo cual con frecuencia disminuye drásticamente el rendimiento general. La lesión severa de la raíz también resulta con frecuencia en la caída de las plantas de maíz,

por lo que la cosecha se torna más difícil y disminuye más aún el rendimiento. Además, la alimentación de los adultos con los tejidos reproductores del maíz puede resultar en el recorte de los estigmas en la punta de la espiga. Si este "recorte de estigmas" es lo suficiente grave durante la liberación del polen, la polinización puede verse afectada.

- 5 El control de gusanos de la raíz del maíz puede intentarse mediante la rotación de cultivos, insecticidas químicos, bioplaguicidas (por ejemplo, la bacteria gram-positiva formadora de esporas, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)), plantas transgénicas que expresan toxinas *Bt*, o una combinación de tales recursos. La rotación de cultivos presenta la desventaja de imponer restricciones no deseadas en el uso del terreno de cultivo. Por otra parte, la oviposición de algunas especies de gusanos de la raíz puede
10 producirse en campos de soja, por lo cual mitiga la efectividad de la rotación de cultivos practicada con el maíz y la soja.

Los insecticidas químicos constituyen la estrategia de mayor confianza para lograr el control del gusano de la raíz del maíz. Sin embargo, el uso de insecticidas químicos, es una estrategia imperfecta de control del gusano de la raíz del maíz; más de 1 mil millones de Dólares Estadounidenses pueden
15 perderse anualmente en los Estados Unidos debido al gusano de la raíz del maíz cuando se agregan los costos de los insecticidas químicos a los costos del daño ocasionado por el gusano de la raíz que puede producirse a pesar del uso de insecticidas. Las altas poblaciones de larvas, las intensas lluvias y la aplicación inadecuada de los insecticidas pueden resultar todas ellas en el control inadecuado del gusano de la raíz del maíz. Además, el uso continuo de insecticidas puede seleccionar para cepas de
20 gusano de la raíz resistentes a insecticidas, así como también plantear cuestiones ambientales significativas debido a la toxicidad para las especies no objetivo.

Los escarabajos europeos del polen (PB, *por sus siglas en inglés*) constituyen plagas graves en colza de semillas oleaginosas, tanto las larvas como los adultos se alimentan de flores y polen. El daño que produce el escarabajo del polen en el cultivo puede causar pérdidas en el rendimiento del 20-40 %. La
25 especie principal de la plaga es *Meligethes aeneus* Fabricius. Actualmente, el control del escarabajo del polen en la colza de semillas oleaginosas depende principalmente de piretroides, de los cuales se espera su eliminación progresiva en virtud de su perfil ambiental y regulador. Por otra parte, se ha informado sobre la resistencia del escarabajo del polen a insecticidas químicos existentes. Por lo tanto, se necesitan con urgencia soluciones de control del escarabajo del polen que sean compatibles con el
30 medio ambiente y con nuevos modos de acción.

En la naturaleza, los escarabajos del polen sobreviven al invierno como adultos en el suelo o bajo colchones de hojas. En la primavera, los adultos emergen de la hibernación, comienzan a alimentarse con flores de malezas, y migran hacia las plantas de colza de semillas oleaginosas en floración y ponen sus huevos en los capullos de las flores de la colza de semillas oleaginosas. Las larvas se alimentan de capullos y flores donde también se desarrollan. Las larvas de etapa tardía hallan un sitio de pupación en el suelo. Los adultos de segunda generación emergen en julio y agosto y se alimentan de diversas plantas en floración antes de hallar los sitios para sobrevivir al invierno.

Las chinches apestosas y otros insectos hemípteros (heterópteros) constituyen otro complejo importante de plagas agrícolas. Se conocen en el mundo más de 50 especies estrechamente relacionadas de chinches apestosas que causan daños a los cultivos. McPherson & McPherson (2000) *Stink bugs of economic importance in America north of Mexico*, CRC Press. Los insectos hemípteros se hallan presentes en un gran número de importantes cultivos que incluyen maíz, soja, frutales, vegetales y cereales.

Las chinches apestosas atraviesan varias etapas de ninfa antes de llegar a la etapa adulta. Estos insectos se desarrollan a partir de huevos hasta la etapa adulta en aproximadamente 30-40 días. Tanto las ninfas como los adultos se alimentan de la savia de tejidos blandos en los que también inyectan enzimas digestivas que causan la digestión y necrosis extraoral del tejido. Después, el material vegetal digerido y los nutrientes son ingeridos. El agotamiento de agua y nutrientes del sistema vascular de la planta resulta en el daño tisular de la planta. El daño en los granos y semillas en desarrollo es el más significativo dado que se reducen considerablemente el rendimiento y la germinación. Se producen múltiples generaciones en climas cálidos que resultan en una presión significativa de insectos. El control actual de las chinches apestosas depende del tratamiento con insecticidas sobre una base de campo individual. Por lo tanto, se necesitan estrategias de control alternativas de carácter urgente a los efectos de minimizar las pérdidas de cultivos en curso.

La interferencia por ARN (iARN) es un proceso que utiliza rutas celulares endógenas, por medio de las cuales una molécula de ARN de interferencia (ARNi) (por ejemplo, una molécula de ARNd_h) que es específica para la totalidad, o cualquier porción de tamaño adecuado, de un gen objetivo resulta en la degradación del ARNm codificado de ese modo. En los últimos años, la iARN se usó para realizar una "supresión" génica en varias especies y en sistemas experimentales; por ejemplo, *Caenorhabditis elegans*, plantas, embriones de insectos, y células en cultivos tisulares. Véase, por ejemplo, Fire *et al.*

(1998) Nature 391:806-11; Martinez *et al.* (2002) Cell 110:563-74; McManus y Sharp (2002) Nature Rev. Genetics 3:737-47.

La iARN realiza la degradación del ARNm a través de una ruta endógena que incluye el complejo de proteínas DICER. DICER escinde las moléculas de ARNd_h largas en fragmentos cortos de aproximadamente 20 nucleótidos, denominados ARN de interferencia pequeños (ARNip). El ARNip se desenrolla en dos ARN de una hebra: la hebra pasajera y la hebra guía. La hebra pasajera se degrada y la hebra guía se incorpora en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC, *por sus siglas en inglés*). Los ácidos microrribonucleicos (miARN) son moléculas estructuralmente muy similares que se escinden de moléculas precursoras que contienen un "bucle" de polinucleótido que conecta las hebras pasajera y guía hibridadas, y pueden incorporarse de manera similar al RISC. El silenciamiento génico postranscripcional se produce cuando la hebra guía se une específicamente a una molécula de ARNm complementaria e induce la escisión mediante Argonauta, el componente catalítico del complejo RISC. Se sabe que este proceso se esparce sistémicamente en todo el organismo a pesar de las concentraciones inicialmente limitadas de ARNip y/o miARN en algunos eucariotas como, por ejemplo, plantas, nemátodos y algunos insectos.

Solamente los transcritos complementarios al ARNip y/o miARN se escinden y degradan y, de este modo, la supresión de la expresión del ARNm es específica de la secuencia. En las plantas, existen varios grupos funcionales de genes DICER. El efecto silenciador de genes de la iARN persiste durante días y, en condiciones experimentales, puede conducir a una disminución de la abundancia del transcrito objetivo del 90 % o más, con la consiguiente reducción de los niveles de la proteína correspondiente. En los insectos, existen al menos dos genes DICER, donde DICER1 facilita la degradación dirigida por miARN mediante Argonauta1. Lee *et al.* (2004) Cell 117 (1):69-81. DICER2 facilita la degradación dirigida por el ARNip mediante Argonauta2.

La patente de los Estados Unidos 7,612,194 y las publicaciones de patentes de los Estados Unidos núm. 2007/0050860, 2010/0192265, y 2011/0154545 describen una biblioteca de 9112 secuencias de etiquetas de secuencias expresadas (EST, *por sus siglas en inglés*) aisladas de pupas de *D. v. virgifera* LeConte. Se sugiere en la patente de los Estados Unidos 7,612,194 y en la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 2007/0050860 unir operativamente a un promotor una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una de varias secuencias parciales particulares de H⁺-ATPasa del tipo vacuolar (V-ATPasa) de *D. v. virgifera* descrita allí para la expresión de ARN antisentido en células vegetales. La publicación de patente de los Estados Unidos núm. 2010/0192265 sugiere la

unión operativa de un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia parcial particular de un gen de *D. v. virgifera* de función desconocida y no descrita (se expresa que la secuencia parcial es 58 % idéntica al producto génico C56C10.3 en *C. elegans*) para la expresión de ARN antisentido en células vegetales. La publicación de patente de los Estados Unidos

5 núm. 2011/0154545 sugiere la unión operativa de un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a dos secuencias parciales particulares de genes de subunidad beta del coatómero de *D. v. virgifera* para la expresión de ARN antisentido en células vegetales. Además, la patente de los Estados Unidos 7,943,819 describe una biblioteca de 906 secuencias de etiquetas de secuencias expresadas (EST) aisladas de larvas, pupas e intestinos medios diseccionados de *D. v. virgifera*
10 LeConte, y sugiere la unión operativa de un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia parcial particular de un gen de la proteína 4b del cuerpo multivesicular cargado de *D. v. virgifera* para la expresión de ARN de doble hebra en células vegetales.

No se proporciona ninguna otra sugerencia en la patente de los Estados Unidos 7,612,194, y en las
15 publicaciones de patentes de los Estados Unidos núm. 2007/0050860, 2010/0192265, y 2011/0154545 para usar alguna secuencia en particular de las más de nueve mil secuencias mencionadas allí para la interferencia por ARN, que no sean las varias secuencias parciales particulares de V-ATPasa y las secuencias parciales particulares de genes de función desconocida. Además, ninguna de la patente de los Estados Unidos 7,612,194, y las publicaciones de patentes de los Estados Unidos núm.
20 2007/0050860, 2010/0192265, y 2011/0154545 proporciona alguna guía sobre cuáles otras secuencias de las nueve mil secuencias proporcionadas serían letales, o incluso de otro modo útiles, en especies de gusanos de la raíz del maíz cuando se usan como ARNdh o ARNip. La patente de los Estados Unidos 7,943,819 no proporciona ninguna sugerencia en cuanto a usar cualquier secuencia en particular de las más de novecientas secuencias allí mencionadas para la interferencia por ARN, que
25 no sea la secuencia parcial particular de un gen de proteína 4b del cuerpo multivesicular cargado. Además, la patente de los Estados Unidos 7,943,819 no proporciona ninguna guía sobre qué otras secuencias de las más de novecientas secuencias proporcionadas serían letales, o incluso de otro modo útiles, en especies de gusanos de la raíz del maíz cuando se usan como ARNdh o ARNip. La publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2013/040173 y la publicación de
30 solicitud PCT núm. WO 2013/169923 describen el uso de una secuencia derivada de un gen de Snf7

de *Diabrotica virgifera* para la interferencia por ARN en el maíz. (También descrito en Bolognesi *et al.* (2012) PLoS ONE 7(10): e47534. doi:10.1371/journal.pone.0047534).

La mayoría abrumadora de secuencias complementarias a los ADN del gusano de la raíz del maíz (como, por ejemplo, los mencionados anteriormente) no proporciona un efecto protector vegetal contra especies de gusanos de la raíz del maíz cuando se usan como ARNdh y ARNip. Por ejemplo, Baum *et al.* (2007) Nature Biotechnology 25:1322-1326, describen los efectos de la inhibición de varios genes objetivo de WCR mediante la iARN. Estos autores informaron que 8 de los 26 genes objetivo que sometieron a prueba no pudieron proporcionar una mortalidad experimentalmente significativa de plagas de coleópteros a una concentración muy elevada de ARNi (por ejemplo, ARNdh) de más de 520 ng/cm².

Los autores de la patente de los Estados Unidos 7,612,194 y la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 2007/0050860 confeccionaron el primer informe sobre la iARN *in planta* en plantas de maíz dirigidas al gusano de la raíz del maíz occidental. Baum *et al.* (2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-6. Estos autores describen un sistema de iARN dietético *in vivo* de alto rendimiento para cribar genes objetivo potenciales para desarrollar maíz de iARN transgénico. De un grupo inicial de genes de 290 objetivos, solamente 14 presentaron potencial de control larvario. Uno de los ARN de doble hebra más efectivo (ARNdh) tenía como objetivo a un gen que codifica la subunidad A de la ATPasa vacuolar (V-ATPasa), y resultó en una rápida supresión del ARNm endógeno correspondiente y activó una respuesta de iARN específica con bajas concentraciones de ARNdh. De este modo, estos autores documentaron por primera vez el potencial para la iARN *in planta* como una posible herramienta de control de plagas, mientras que a la vez demostraron que los objetivos efectivos no se podían identificar con precisión *a priori*, aun a partir de un conjunto relativamente pequeño de genes candidatos.

DESCRIPCIÓN

Se describen en la presente moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, genes objetivo, ADN, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp y ARNhorq), y métodos de uso de tales moléculas, para el control de plagas de insectos, que incluyen, por ejemplo, plagas de coleópteros, como, por ejemplo, *D. v. virgifera* LeConte (gusano de la raíz del maíz occidental, "WCR"); *D. barberi* Smith y Lawrence (gusano de la raíz del maíz del norte, "NCR"); *D. u. howardi* Barber (gusano de la raíz del maíz del sur, "SCR"); *D. v. zea* Krysan y Smith (gusano de la raíz del maíz mexicano, "MCR"); *D. balteata* LeConte; *D. u.*

tenella; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; *D. speciosa* Germar, y *Meligethes aeneus* Fabricius (escarabajo del polen, "PB"); y plagas de hemípteros, como, por ejemplo, *Euschistus heros* (Fabr.) (chinche café neotropical, "BSB"); *E. servus* (Say) (chinche café); *Nezara viridula* (L.) (chinche verde del sur); *Piezodorus guildinii* (Westwood) (chinche de la alfalfa); *Halyomorpha halys* (Stål) (chinche café marmolada); *Chinavia hilare* (Say) (chinche verde); *C. marginatum* (Palisot de Beauvois); *Dichelops melacanthus* (Dallas); *D. furcatus* (F.); *Edessa meditabunda* (F.); *Thyanta perditor* (F.) (chinche de hombros rojos neotropical); *Horcias nobilellus* (Berg) (chinche del algodón); *Taedia stigmosa* (Berg); *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Méneville); *Neomegalotomus parvus* (Westwood); *Leptoglossus zonatus* (Dallas); *Niesthrea sidae* (F.); *Lygus hesperus* (Knight) (chinche opaca de las plantas occidental); y *L. lineolaris* (Palisot de Beauvois). En los ejemplos particulares, se describen moléculas de ácido nucleico ejemplares que pueden ser homólogas al menos a una porción de uno o más ácidos nucleicos nativos en una plaga de insectos.

En estos y otros ejemplos, la secuencia de ácido nucleico nativo puede ser un gen objetivo, cuyo producto puede, por ejemplo, en forma no taxativa: participar en un proceso metabólico o en el desarrollo larvario o de ninfa. En algunos ejemplos, la inhibición postranscripcional de la expresión de un gen objetivo mediante una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido homólogo a ella puede ser letal para una plaga de insectos o resultar en un crecimiento reducido y/o menor viabilidad de una plaga de insectos. En los ejemplos específicos, el gen *ARN polimerasa II215* (mencionado en la presente como, por ejemplo, *rpII215*) o un homólogo de *rpII215* puede seleccionarse como gen objetivo para el silenciamiento postranscripcional. En los ejemplos particulares, un gen objetivo útil para la inhibición postranscripcional es un gen *ARN polimerasa II215*, gen que se menciona en la presente como *rpII215-1* de *Diabrotica virgifera* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1), *rpII215-2* de *D. virgifera* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3), *rpII215-3* de *D. virgifera* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5), *rpII215-1* de *Euschistus heros* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77), *rpII215-2* de *E. heros* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79), el gen mencionado en la presente como *rpII215-3* de *E. heros* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81), o el gen mencionado en la presente como *rpII215* de *Meligethes aeneus* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107). Por lo tanto, se describe en la presente una molécula de ácido nucleico aislada que comprende el polinucleótido de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; SEC. CON NÚM. DE

IDENT.:5; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107; el
5 complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107; y/o fragmentos de cualquiera de los mencionados anteriormente (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111, y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:109).

Se describen también moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica un
10 polipéptido que es al menos aproximadamente 85 % idéntico a una secuencia de aminoácidos dentro de un producto génico objetivo (por ejemplo, el producto de un gen *rpII215*). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido que es al menos 85 % idéntico a la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2 (RPII215-1 de *D. virgifera*), SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4 (RPII215-2 de *D. virgifera*), SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6 (RPII215-3 de *D.*
15 *virgifera*), SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78 (RPII215-1 de *E. heros*), SEC. CON NÚM. DE IDENT.:80 (RPII215-2 de *E. heros*), SEC. CON NÚM. DE IDENT.:82 (RPII215-3 de *E. heros*), o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:112 (RPII215 de *M. aeneus*); y/o una secuencia de aminoácidos dentro de un producto de *rpII215-1* de *D. virgifera*, *rpII215-2* de *D. virgifera*, *rpII215-3* de *D. virgifera*, *rpII215-1* de *E. heros*, *rpII215-2* de *E. heros*, *rpII215-3* de *E. heros*, o *rpII215* de *M. aeneus*. Se
20 describen también moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que es el complemento inverso de un polinucleótido que codifica un polipéptido al menos 85 % idéntico a una secuencia de aminoácidos dentro de un producto génico objetivo.

Se describen también polinucleótidos de ADNc que pueden usarse para la producción de moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y ARNhorq) que son complementarias a la
25 totalidad o parte de un gen objetivo de una plaga de insectos, por ejemplo, un gen *rpII215*. En modalidades particulares, ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y/o ARNhorq pueden producirse *in vitro* o *in vivo*, por un organismo genéticamente modificado, como, por ejemplo, una planta o una bacteria. En los ejemplos particulares, se describen moléculas de ADNc que pueden usarse para producir moléculas de ARNi que son complementarias a la totalidad o parte de un gen *rpII215* (por
30 ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79; SEC. CON NÚM.

DE IDENT.:81; y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107), por ejemplo, un gen *rpII215* de WCR (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3 y SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 5), un gen *rpII215* de BSB (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79, y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81) o un gen *rpII215* de PB (por ejemplo SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107).

Se describen también medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros, y medios para proporcionar la protección a una planta contra plagas de coleópteros. Un medio para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros es una molécula de ARN de una hebra o doble hebra que consiste en un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:98-100 y 123; y sus complementos. Los equivalentes funcionales de los medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros incluyen moléculas de ARN de una hebra o doble hebra que son sustancialmente homólogas a la totalidad o parte de un gen *rpII215* de coleóptero que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8, y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9, y moléculas de ARN de una hebra o doble hebra que son sustancialmente homólogas a un gen *rpII215* de coleópteros que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y/o la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:117. Un medio para proporcionar protección a una planta contra plagas de coleópteros es una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un medio para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros operativamente unido a un promotor, en donde la molécula de ADN es capaz de integrarse en el genoma de una planta.

Se describen también medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de hemípteros, y medios para proporcionar protección a una planta contra plagas de hemípteros. Un medio para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de hemípteros es una molécula de ARN de una hebra o doble hebra que consiste en un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104-106 y sus complementos. Los equivalentes funcionales de los medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de hemípteros incluyen moléculas de ARN de una hebra o doble hebra que son sustancialmente homólogas a la totalidad o parte de un gen *rpII215* de hemípteros que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:84, y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85. Un medio para proporcionar protección a una planta contra plagas de hemípteros es una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un medio para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de hemípteros

operativamente unido a un promotor, en donde la molécula de ADN es capaz de integrarse el genoma de una planta.

Se describen adicionalmente métodos para controlar una población de una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de coleópteros o hemípteros), que comprenden proporcionar a una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de coleópteros o hemípteros) una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y ARNhorq) que funciona al ser absorbida por la plaga para inhibir una función biológica dentro de la plaga.

En algunas modalidades, los métodos para controlar una población de una plaga de coleópteros comprenden proporcionar a la plaga de coleópteros una molécula de ARNi que comprende la totalidad o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:96; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:96; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:97; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:97; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:98; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:98; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:100; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:100; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:118; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:118; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:119; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:119; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:120; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:120; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:121; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:121; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:122; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:122; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:123; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:123; un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido de *rpII215* nativo de una plaga de coleópteros (por ejemplo, WCR o PB); el complemento de un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido de *rpII215* nativo de una plaga de coleópteros; un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, y 7-9; el complemento de un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, y 7-9; un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende la totalidad o parte de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107-111 y 117; y el complemento de un

polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107-111 y 117.

En otras modalidades, un método para controlar una población de una plaga de hemípteros comprende proporcionar a la plaga de hemípteros una molécula de ARNi que comprende la totalidad o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:102; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:102; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:105; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:105; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106; un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido de *rpII215* nativo de una plaga de hemípteros (por ejemplo, BSB); el complemento de un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido de *rpII215* nativo de una plaga de hemípteros; un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, 81 y 83-85; y el complemento de un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, 81, y 83-85.

En modalidades particulares, un ARNi que funciona al ser absorbido por una plaga de insectos para inhibir una función biológica dentro de la plaga se transcribe a partir de un ADN que comprende la totalidad o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:109; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:109; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:110; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:110; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:111; el complemento de SEC. CON NÚM. DE

IDENT.:111; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:117; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:117; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, y 7-9; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, y 7-9; un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, 81, y 83-85; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende la totalidad o parte de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, 81, y 83-85; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107-111 y 117; y el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107-111 y 117.

Se describen también en la presente métodos en los que puede proporcionarse ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y/o ARNhorq a una plaga de insectos en un ensayo basado en la dieta o en células vegetales genéticamente modificadas que expresan ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y/o ARNhorq. En estos y otros ejemplos, los ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y/o ARNhorq pueden ingerirse por la plaga. La ingestión de los ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y/o ARNhorq de la invención puede resultar entonces en la iARN en la plaga, que a su vez puede resultar en el silenciamiento de un gen esencial para la viabilidad de la plaga y conducir finalmente a la mortalidad. De este modo, se describen métodos en donde las moléculas de ácido nucleico que comprenden polinucleótidos ejemplares útiles para el control de plagas de insectos se proporcionan a una plaga de insectos. En los ejemplos particulares, una plaga de coleópteros y/o hemípteros controlada por el uso de moléculas de ácido nucleico de la invención puede ser WCR, NCR, SCR, *D. undecimpunctata howardi*, *D. balteata*, *D. undecimpunctata tenella*, *D. speciosa*, *D. u. undecimpunctata*, *Meligethes aeneus*, BSB, *E. servus*; *Nezara viridula*; *Piezodorus guildinii*; *Halyomorpha halys*; *Chinavia hilare*; *C. marginatum*; *Dichelops melacanthus*; *D. furcatus*; *Edessa mediatunda*; *Thyanta perditor*; *Horcias nobilellus*; *Taedia stigmosa*; *Dysdercus peruvianus*; *Neomegalotomus parvus*; *Leptoglossus zonatus*; *Niesthrea sidae*; *Lygus hesperus*; o *L. lineolaris*.

Lo expuesto anteriormente y otras características serán más evidentes a partir de la siguiente Descripción Detallada de varias modalidades, que procede con referencia a las Figuras 1-2 que se acompañan.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 incluye una ilustración de una estrategia usada para proporcionar ARNdh a partir de una única plantilla de transcripción con un único par de cebadores.

La Figura 2 incluye una ilustración de una estrategia usada para proporcionar ARNdh a partir de dos plantillas de transcripción.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias de ácido nucleico mencionadas en el listado de secuencias que se acompaña se muestran con el uso de abreviaturas de letras estándar para bases de nucleótidos, de acuerdo con lo definido en el artículo 1,822 del Título 37 del Código de Normas Federales. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos mencionadas definen moléculas (es decir, polinucleótidos y polipéptidos, respectivamente) que tienen los monómeros de nucleótidos y aminoácidos dispuestos en la manera descrita. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos mencionadas también definen cada una un género de polinucleótidos o polipéptidos que comprenden los monómeros de nucleótidos y aminoácidos dispuestos de la manera descrita. En virtud de la redundancia del código genético, se entenderá que una secuencia de nucleótidos que incluye una secuencia codificante también describe el género de polinucleótidos que codifican el mismo polipéptido que un polinucleótido que consiste en la secuencia de referencia. Se entenderá además que una secuencia de aminoácidos describe el género de marcos abiertos de lectura (ORF, *por sus siglas en inglés*) de polinucleótidos que codifican ese polipéptido.

20

25

Se muestra solamente una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria se halla incluida mediante cualquier referencia a la hebra mostrada. Dado que el complemento y el complemento inverso de una secuencia de ácido nucleico primaria se describen necesariamente mediante la secuencia primaria, la secuencia complementaria y la secuencia complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos se hallan incluidas mediante cualquier referencia a la secuencia de ácidos nucleicos, a menos que se mencione explícitamente de otro modo (o que resulte claro de otro modo a partir del contexto en el que aparece la secuencia). Además, tal

30

como se entiende en la técnica que la secuencia de nucleótidos de una hebra de ARN es determinada por la secuencia del ADN del cual se transcribió (excepto por la sustitución de nucleobases de uracilo (U) por timina (T)), una secuencia de ARN se incluye mediante cualquier referencia a la secuencia de ADN que la codifica. En el listado de secuencias que se acompaña:

5 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 muestra un cóntigo que contiene un ADN de *rpII215* de WCR ejemplar, mencionado en la presente en algunos lugares como *rpII215* de WCR o *rpII215-1* de WCR:

GATGACACTGAACACTTTCCATTTCGCCGGTGTGTCTTCGAAGAACGTAACACTTGGTG
TGCCTCGATTGAAGGAAATCATCAACATATCCAAGAAGCCCAAGGCTCCATCTCTAACC
GTATTTTTGACTGGAGGTGCTGCTCGTGATGCAGAAAAAGCGAAAAATGTACTCTGTCTG
10 CCTGGAACACACAACACTGCGAAAGGTCACAGCTAACACAGCAATCTATTACGATCCA
GATCCACAACGAACGGTTATCGCAGAGGATCAAGAATTTGTCAACGTCTACTATGAAAT
GCCTGATTTTCGATCCGACTCGAATCTCACCGTGGTTGTTGCGTATCGAATTGGATCGTAA
ACGAATGACGGAAAAGAAATTGACCATGGAACAGATTGCCGAGAAAATCAACGCCGGT
TTCGGTGACGACTTGAATTGCATCTTTAACGATGACAATGCTGACAAATTGGTTCTGCGC
15 ATTCGTATAATGAATGGCGAGGACAACAAATTCCAAGACAATGAGGAGGACACGGTCG
ATAAAATGGAGGACGACATGTTTTTTCGATGCATTGAAGCGAATATGTTGTCTGGACATG
ACGTTGCAAGGTATCGAGGCAATTGGAAAGGTGTACATGCACTTGCCACAGACCGATA
GCAAGAAACGAATTGTTATCACGGAACTGGTGAATTTAAGGCCATCGGCGAATGGTT
ACTCGAACTGACGGTACATCGATGATGAAAGTTCTAAGTGAAAGAGATGTAGATCCG
20 GTTCGAACATTCAGCAACGATATCTGCGAAATTTTCCAGGTGTTGGGAATCGAAGCAGT
ACGAAAATCAGTCGAGAAAGAAATGAACGCTGTGCTGCAGTTCTACGGATTGTACGTG
AATTATCGTCACTTGGCCTTGTTGTGTGACGTCATGACAGCCAAAGGTCATTTGATGGCC
ATCACACGTCACGGCATTACAGACAGGACACTGGTGC GTTGATGAGATGCTCGTTCTGA
AGAACTGTTGATGTGCTTATGGACGCTGCATCGCATGCCGAAAACGATCCTATGCGTG
25 GTGTGTCGGAAAATATTATTATGGGACAGTTACCCAAGATGGGTACAGGTTGTTTTGAT
CTCTTACTGGATGCCGAAAAATGCAAGTATGGCATCGAAATACAGAGCACTCTAGGACC
GGACTTAATGAGTGGAACAGGAATGTTCTTTGGTGCTGGATCAACACCATCGACGCTTA
GTTTCATCGAGACCTCCATTGTAA

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de
30 RPII215 codificado por un ADN de *rpII215* de WCR ejemplar, mencionado en la presente en algunos lugares como RPII215 o RPII215-1 de de WCR:

MTLNTHFHAGVSSKNVTLGVPRLKEIINISKKPKAPSLTVFLTGGAARDAEKAKNVLCRLEH
TTLRKVTANTAIYYDPDPQRTVIAEDQEFVNVYYEMPDPTRISPWLLRIELDRKRMTEKK
LTMEQIAEKINAGFGDDLNCIFNDDNADKLVLIRIMNGEDNKFQDNEEDTVDKMEDDMFL
RCIEANMLSDMTLQGIEAIGKVYMHLPQTDSSKRIVITETGEFKAIGEWLLETDGTSMMKVL
5 SERDVPVVRTFSNDICEIFQVLGIEAVRKSVEKEMNAVLQFYGLYVNYRHLALLCDVMTAK
GHLMAITRHGINRQDTGALMRCSEETVDVLM DAASHAENDPMRGVSENIIMGQLPKMGT
GCFDLLLLDAEKCKYGIEIQSTLGPDLMSGTGMFFGAGSTPSTLSSSRPPLL

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3 muestra un cóntigo que comprende un ADN de *rpII215* de WCR
ejemplar adicional, mencionado en la presente en algunos lugares como *rpII215-2* de WCR:

10 TGCTCGACCTGTAGATTCTTGTAACGGATTCGGAGAGTTCGATTCGTTGTGCGAGCCTTC
AAAATGGCTACCAACGATAGTAAAGCTCCGTTGAGGACAGTTAAAAGAGTGCAATTTG
GAATACTTAGTCCAGATGAAATTAGACGAATGTCAGTCACAGAAGGGGGGCATCCGCTTC
CCAGAAACCATGGAAGCAGGCCGCCCAA ACTATGCGGTCTTATGGACCCCAGACAAG
GTGTCATAGACAGAAGCTCAAGATGCCAGACATGTGCCGGAAATATGACAGAATGTCC
15 TGGACATTTCCGGACATATCGAGCTGGCAAACCAGTTTTCCACGTAGGATTCGTAACAA
AAACAATAAAGATCTTGAGATGCGTTTGCTTCTTTTGCAGTAAATTATTAGTCAGTCCAA
ATAATCCGAAAATTAAAGAAGTTGTAATGAAATCAAAGGGACAGCCACGTAAAAGATT
AGCTTTCGTTTATGATCTGTGTAAAGGTAAAAATATTTGTGAAGGTGGAGATGAAATGG
ATGTGGGTAAAGAAAGCGAAGATCCCAATAAAAAAGCAGGCCATGGTGGTTGTGGTCG
20 ATATCAACCAAATATCAGACGTGCCGGTTTAGATTTAACAGCAGAATGGAAACACGTCA
ATGAAGACACACAAGAAAAGAAAATCGCACTATCTGCCGAACGTGTCTGGGAAATCCT
AAAACATATCACAGATGAAGAATGTTTCATTCTTGGTATGGATCCCAAATTTGCTAGAC
CAGATTGGATGATAGTAACGGTACTTCCTGTTCCCTCCCTAGCAGTACGACCTGCTGTA
GTTATGCACGGATCTGCAAGGAATCAGGATGATATCACTCACAAATTGGCCGACATTAT
25 CAAGGCGAATAACGAATTACAGAAGAACGAGTCTGCAGGTGCAGCCGCTCATATAATC
ACAGAAAATATTAAGATGTTGCAATTTACGTCGCCACTTTAGTTGACAACGATATGCC
GGGAATGCCGAGAGCAATGCAAAAATCTGGAAAACCCCTAAAAGCTATCAAAGCTCGG
CTGAAAGGTAAAGAAGGAAGGATTTCGAGGTAACCTTATGGGAAAGCGTGTGGACTTTT
CTGCACGTACTGTCATCACACCAGATCCCAATTTACGTATCGACCAAGTAGGAGTGCCT
30 AGAAGTATTGCTCAAAACATGACGTTTCCAGAAATCGTCACACCTTTCAATTTTGACAA
AATGTTGGAATTGGTACAGAGAGGTAATTCTCAGTATCCAGGAGCTAAGTATATCATCA

GAGACAATGGAGAGAGGATTGATTTACGTTTCCACCCAAAACCGTCAGATTTACATTTG
 CAGTGTGGTTATAAGGTAGAAAGACACATCAGAGACGGCGATCTAGTAATCTTCAACC
 GTCAACCAACCCTCCACAAGATGAGTATGATGGGCCACAGAGTCAAAGTCTTACCCTGG
 TCGACGTTCCGTATGAATCTCTCGTGCACCTCTCCCTACAACGCCGATTTTGACGGCGAC
 5 GAAATGAACCTCCATGTGCCCCAAAGTATGGAAACTCGAGCTGAAGTCGAAAACCTCC
 ACATCACTCCCAGGCAAATCATTACTCCGCAAGCTAACCAACCCGTCATGGGTATTGTA
 CAAGATACGTTGACAGCTGTTAGGAAGATGACAAAAAGGGATGTATTCATCGAGAAGG
 AACAAATGATGAATATATTGATGTTCTTGCCAATTTGGGATGGTAAAATGCCCCGTCCA
 GCCATCCTCAAACCCAAACCGTTGTGGACAGGAAAACAGATATTTTCCCTGATCATTCC
 10 TGGCAATGTAAATATGATACGTACCCATTCTACGCATCCAGACGACGAGGACGACGGTC
 CCTATAAATGGATATCGCCAGGAGATACGAAAGTTATGGTAGAACATGGAGAATTGGT
 CATGGGTATATTGTGTAAGAAAAGTCTTGGAACATCAGCAGGTTCCCTGCTGCATATTT
 GTATGTTGGAATTAGGACACGAAGTGTGTGGTAGATTTTATGGTAACATTCAAACCTGTA
 ATCAACAACCTGGTTGTTGTTAGAAGGTCACAGCATCGGTATTGGAGACACCATTGCCGA
 15 TCCTCAGACTTACACAGAAATTCAGAGAGCCATCAGGAAAGCCAAAGAAGATGTAATA
 GAAGTCATCCAGAAAGCTCACACATGGAACCTGGAACCGACTCCCGGTAATACGTTGC
 GTCAGACTTTCGAAAATCAAGTAAACAGAATTCTAAACGACGCTCGTGACAAAACCTGGT
 GGTTCCGCTAAGAAATCTTTGACTGAATACAATAACCTAAAGGCTATGGTCGTATCGGG
 ATCCAAGGGATCCAACATTAATATTTCCCAGGTTATTGCTTGCGTGGGTCAACAGAACG
 20 TAGAAGGTAAACGTATTCCATTTGGCTTCAGAAAACGCACGTTGCCGCACTTCATCAAG
 GACGATTACGGTCCTGAATCCAGAGGTTTCGTAGAAAATTCGTATCTTGCCGGTCTCAC
 TCCTTCGGAGTTCTATTTCCACGCTATGGGAGGTCGTGAAGGTCTTATCGATACTGCTGT
 AAAAAGTCCGAAACTGGTTACATCCAACGTCGTCTGATAAAGGCTATGGAGAGTGTA
 ATGGTACACTACGACGGTACCGTAAGAAATTCTGTAGGACAACCTATCCAGCTGAGATA
 25 CGGTGAAGACGGACTCTGTGGAGAGATGGTAGAGTTTCAATATTTAGCAACAGTCAAAT
 TAAGTAACAAGGCGTTTGAGAGAAAATTCAGATTTGATCCAAGTAATGAAAGGTATTTG
 AGAAGAGTTTTCAATGAAGAAGTTATCAAGCAACTGATGGGTTCAGGGGAAGTCATTTC
 CGAACTTGAGAGAGAATGGGAACAACCTCCAGAAAGACAGAGAAGCCTTAAGACAAATC
 TTCCCTAGCGGAGAATCTAAAGTAGTACTCCCCTGTAACCTACAACGTATGATCTGGAA
 30 TGTACAAAAAATTTTCCACATAAAACAACGAGCCCCGACAGACCTGTCCCCGTAAAGAG
 TTATCCAAGGCGTTCGAGAATTACTCAGGAAATGCGTCATCGTAGCTGGCGAGGATCGT

CTGTCCAAACAAGCCAACGAAAACGCAACGTTACTCTTCCAGTGTCTAGTCAGATCGAC
 CCTCTGCACCAAATGCGTTTCTGAAGAATTCAGGCTCAGCACCGAAGCCTTCGAGTGGT
 TGATAGGAGAAATCGAGACGAGGTTCCAACAAGCCCAAGCCAATCCTGGAGAAATGGT
 GGGCGCTCTGGCCGCGCAGTCACTGGGAGAACCCGCTACTCAGATGACACTGAACACTT
 5 TCCATTTTGCTGGTGTATCCTCCAAGAACGTAACCCTGGGTGTACCTAGATTAAAGGAA
 ATTATTAATATTTCCAAGAAACCCAAGGCTCCATCTCTAACCGTGTTTTTAACTGGTGCG
 GCTGCTAGAGATGCGGAAAAAGCGAAGAATGTGTTATGCAGACTTGAACACACCACTC
 TTCGTAAAGTAACCGCCAACACCGCCATCTATTACGATCCTGACCCACAAAATACCGTC
 ATTCCTGAGGATCAGGAGTTCGTTAACGTCTACTATGAAATGCCCGATTTCGATCCTACC
 10 CGTATATCGCCGTGGTTGCTTCGTATCGAACTGGACAGAAAGAGAATGACAGATAAGA
 AACTAACTATGGAACAAATTGCTGAAAAGATCAACGCTGGGTTCGGGGACGATTTGAA
 TTGTATTTTCAACGACGACAATGCTGAAAAGTTGGTGCTGCGTATCAGAATCATGAACA
 GCGACGATGGAAAATTCGGAGAAGGTGCTGATGAGGACGTAGACAAAATGGATGACGA
 CATGTTTTTGTAGATGCATCGAAGCGAACATGCTGAGCGATATGACCTTGCAAGGTATAG
 15 AAGCGATTTCCAAGGTATACATGCACTTGCCACAGACTGACTCGAAAAAAAGGATCGTC
 ATCACTGAAACAGGCGAATTTAAGGCCATCGCAGAATGGCTATTGGAAACTGACGGTA
 CCAGCATGATGAAAGTACTGTCAGAAAGAGACGTCGATCCGGTCAGGACGTTTTCTAAC
 GACATTTGTGAAATATTTTCGGTACTTGGTATCGAGGCTGTGCGTAAGTCTGTAGAGAA
 AGAAATGAACGCTGTCCTTTTATTCTACGGTCTGTACGTAAACTATCGCCATCTTGCCTT
 20 GCTTTGTGACGTAATGACAGCCAAAGGTCACTTAATGGCCATCACCCGTCACGGTATCA
 ACAGACAAGACACTGGAGCTCTGATGAGGTGTTCTTCGAGGAAACTGTAGATGTATTG
 ATGGACGCTGCCAGTCATGCGGAGGTGACCCAATGAGAGGAGTATCTGAAAACATTA
 TCCTCGGTCAACTACCAAGAATGGGCACAGGCTGCTTCGATCTTTTGCTGGACGCCGAA
 AAATGTAAAATGGGAATTGCCATACCTCAAGCGCACAGCAGCGATCTAATGGCTTCAG
 25 GAATGTTCTTTGGATTAGCCGCTACACCCAGCAGTATGAGTCCAGGTGGTGCTATGACC
 CCATGGAATCAAGCAGCTACACCATACGTTGGCAGTATCTGGTCTCCACAGAATTTAAT
 GGGCAGTGGAATGACACCAGGTGGTGCCGCTTTCTCCCCATCAGCTGCGTCAGATGCAT
 CAGGAATGTCACCAGCTTATGGCGGTTGGTCACCAACACCACAATCTCCTGCAATGTCG
 CCATATATGGCTTCTCCACATGGACAATCGCCTTCCTACAGTCCATCAAGTCCAGCGTTC
 30 CAACCTACTTCACCATCCATGACGCCGACCTCTCCTGGATATTCTCCCAGTTCTCCTGGT
 TATTCACCTACCAGTCTCAATTACAGTCCAACGAGTCCCAGTTATTCACCCACTTCTCAG

AGTTACTCCCCAACCTCACCTAGTTACTCACCGACTTCTCCAAATTATTCACCTACTTCC
 CCAAGCTACAGTCCAACATCCCCTAACTATTCACCAACATCTCCCAACTATTCACCCACT
 TCACCTAGTTATCCTTCAACTTCGCCAGGTTACAGCCCCACTTCACGCAGCTACTCACCC
 ACATCTCCTAGTTACTCAGGAACCTTCGCCCTCTTATTCACCAACTTCGCCAAGTTACTCC
 5 CCTACTTCTCCTAGTTATTCGCCGTCGTCTCCTAATTACTCTCCCACTTCTCCAAATTACA
 GTCCCACTTCTCCTAATTACTCACCGTCCTCTCCTAGGTACACGCCCGGTTCTCCTAGTTT
 TTCCCCAAGTTCGAACAGTTACTCTCCACATCTCCTCAATATTCTCCAACATCTCCAAG
 TTATTCGCCTTCTTCGCCCAAATATTCACCAACTTCCCCCAATTATTTCGCCAACATCTCC
 ATCATTTTCTGGAGGAAGTCCACAATATTCACCCACATCACCGAAATACTCTCCAACCT
 10 CGCCCAATTACACTCTGTCGAGTCCGCAGCACACTCCAACAGGTAGCAGTCGATATTCA
 CCGTCAACTTCGAGTTATTCTCCTAATTCGCCCAATTATTCACCGACGTCTCCACAATAC
 TCCATCCACAGTACAAAATATTCCCCTGCAAGTCCTACATTCACACCCACCAGTCCTAGT
 TTCTCTCCCGCTTCACCCGCATATTCGCCTCAACCTATGTATTACCTTCTTCTCCTAATT
 ATTCTCCCACTAGTCCCAGTCAAGACACTGACTAAATATAATCATAAGATTGTAGTGGT
 15 TAGTTGTATTTTATACATAGATTTTAATTCAGAATTTAATATTATTTTTTACTATTTACCA
 GGGACATTTTTTAAAGTTGTAAAAACACTTACATTTGTTCCAACGGATTTTTGCACAAACG
 TAACGAAGTTAAATCAAAACATTACAACCTGAAACATACGTCGGTATGTACTGTCAATGT
 GATCATTAGGAAATGGCTATTATCCCGGAGGACGTATTTTATAAAGTTATTTTATTGAAG
 TGTTTGATCTTTTTTCACTATTGAGGAGATTTATGGACTCAACATTAAACAGCTTGAACA
 20 TCATACCGACTACTACTAATATAAAGATAAATATAGAACGGTAAGAAATAGATTAAAA
 AAAAATACAATAAGTTAAACAGTAATCATAAAAATAAATACGTTTCCGTTTCGACAGAA
 CTATAGCCAGATTCTTGTAAGTATAATGAAAATTTGTAGGTTAAAAATATTACTTGTCACA
 TTAGCTTAAAAATAAAAAATTACCGGAAGTAATCAAATAAGAGAGCAACAGTTAGTCG
 TTCTAACAATTATGTTTGAAAATAAAAAATTACAATGAGTTATACAAACGAAGACTACAA
 25 GTTTAAATAGTATGAAAAACTATTTGTAAACACAACAAATGCGCATTGAAATTTATTTA
 TCGTACTTAACTTATTTGCCTTACAAAAATAATACTCCGCGAGTATTTTTTATGAACTGT
 AAAACTAAAAAGTTGTACAGTTCACACAAAAACATCGAAAAATTTTGTTTTTGTATGTT
 TCTATTATTAAAAAAATACTTTTTATCTTTCACCTTATAGGTACTATTTGACTCTATGACA
 TTTTCTCTACATTTCTTTAAATCTGTTCTATTTATTATGTACATGAATCTATAAGCACAAA
 30 TAATATACATAATCATTTTGATAAAAAATCATAGTTTTAAATAAAACAGATTTCAACAC
 AATATTCATAAGTCTACTTTTTTAAAAATTTATAGAGACAAAGGCCATTTTTTCAGAAACA

GATTAAACAAAAATCACTATAAATTATTTTGAGTATGTTGAATAAGTTTATATTGCTTCT
ACAATTTTTTAAATATAAAATTATAACATTAGCAGAGGAACAACGAGAATTAAGGTCGG
GAAGATCATGCACCGA

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de
5 RPII215 de WCR codificado por un ADN de *rpII215* de WCR ejemplar adicional (es decir, *rpII215*-
2):

MATNDSKAPLRTVKRVQFGILSPDEIRMSVTEGGIRFPETMEAGRPKLCGLMDPRQGVIDR
SSRCQTCAGNMTECPGHFGHIELAKPVFHVGFVTKTIKILRCVCFCSKLLVSPNNPKIKEVV
MKS KGQPRKRLAFVYDLCKGKNICEGGDEMDVGKESEDPNKKAGHGGCGRYQPNIRRAG
10 LDLTAEWKHVNEDTQEKKIALSAERVWEILKHITDEECFILGMDPKFARPDWMIVTVLPVPP
LAVRPAVVMHGSARNQDDITHKLADIHKANNELQKNESAGAAHIITENIKMLQFHVATLV
DNDMPGMPRAMQKSGKPLKAIKARLKGKEGRIRGNLMGKRVD FSARTVITPDPNLRIDQV
GVPRSIAQNMTPFEIVTPFNFDKMLELVQRGNSQYPGAKYIIRDNGERIDLRFHPKPSDLHLQ
CGYKVERHIRDGD LVIFNRQPTLHKMSMMGHRVKVLPWSTFRMNL SCTSPYNADFDGDE
15 MNLHVPQSMETRAEVENLHITPRQIITPQANQPVMGIVQDTLTAVRKMTKRDVFIEKEQMM
NILMFLPIWDGKMPPAILKPKPLWTGKQIFSLIIPGNVNMIRTHSTHPDDEDDGPYKWISPG
DTKVMVEHGELVMGILCKKSLGTSAGSLLHICMLELGHEVCGRFYGNIQTVINNWLLEGH
SIGIGDTIADPQTYTEIQRAIRKAKEDVIEVIQKAHNMELEPTPGNTLRQTFENQVNRILNDAR
DKTGGSAKKS LTEYNNLKAMVVSGSKGSNINISQVIACVGQQNVEGKRIPFGFRKRTLPHFI
20 KDDYGPE SRGFVENSYLAGLTPSEFYFHAMGGREGLIDTAVKTAETGYIQRRLIKAMESVM
VHYDGTVRNSVGQLIQLRYGEDGLCGEMVEFQYLATVKLSNKA FERKFRFDPSNERYLRR
VFNEEVIKQLMGSGEVISELEREWEQLQKDREALRQIFPSGESKVVLPCNLQRMIVNVQKIF
HINKRAPTDLSPLRVIQGVRELLRKCVIVAGEDRLSKQANENATLLFQCLVRSTLCTKCVSE
EFRLSTEAFEWLIGEIETRFQQAQANPGEMVGALAAQSLGEPATQMTLNTFHFAGVSSKNV
25 TLGVPRLKEIINISKKPKAPSLTVFLTGAAARDAEKAKNVLCRLEHTTLRKVTANTAIYYDP
DPQNTVIPEDQEFVNVYYEMP DFDPTRISPWLLRIELDRKRM TDKKLTMEQIAEKINAGFGD
DLNCIFNDDNAEKLVLIRIMNSDDGKFGEGADEDVDKMDDDMFLRCIEANMLS DMTLQG
IEAISKVYMHL PQTDSKKRIVITETGEFKAIAEWLLET DGTSM MKVLSERDVPVRTFSNDIC
EIFSVLGIEAVRKSVEKEMNAVLSFYGLYVNYRHLALLCDVMTAKGHLMAITRHGINRQDT
30 GALMRCSFEETVDVLM DAASHAEVDPMRGVSENIILGQLPRMGTGCFDLLLLDAEKCKMGI
AIPQAHSSDLMASGMFFGLAATPSSMSPGGAMTPWNQAATPYVGSIWSPQNLMGSGMTPG

GAAFSPSAASDASGMSPAYGGWSPTPQSPAMSPYMASPHGQSPSYSPSSPAFQPTSPSMTPT
 SPGYSPSSPGYSPTSLNYSPTSPSYSPTSQSYSPSPSYSPSPNYSPSPSYSPSPNYSPSPNY
 SPTSPSYPTSPGYSPTSRSYSPSPSYSGTSPSYSPSPSYSPSPSYSPSSPNYSPTSPNYSPSP
 NYSPSSPRYTPGSPSFSPSSNSYSPTSPQYSPTSPSYSPSSPKYSPTSPNYSPSPSFSGGSPQYSP
 5 TSPKYSPTSPNYTLSSPQHPTGSSRYSPSTSSYSPNSPNYSPTSPQYSIHSTKYSPASPTFTPTS
 PSFSPASPAYSPPQPMYSPSSPNYSPTSPSQDTD

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5 muestra un cóntigo que contiene un ADN de *rpII215* de WCR
 ejemplar adicional, mencionado en la presente en algunos lugares como *rpII215-3* de WCR:

10 ATCACGCGTCACGGTATCAACAGAGATGACTCTGGTCCTCTTGTGCGATGCTCGTTCTGA
 AGAAACCGTTGAAATTCTCATGGACGCTGCCATGTTCTCTGAAGGAGACCCATTGACTG
 GTGTGTCTGAAAACGTGATGCTTGGTCAATTGGCTCCGCTCGGTACTGGTTTGATGGACC
 TTGTGTTGGATGCGAAGAAATTGGCAAACGCCATCGAGTACGAAGCATCTGAAATCCA
 GCAAGTGATGCGAGGTCTGGACAACGAGTGGAGAAGTCCAGACCATGGACCTGGAACT
 15 CCAATCTCGACTCCATTCGCATCGACTCCAGGTTTCACGGCTTCTTCTCCTTTTCAGCCCT
 GGTGGTGGTGC GTTCTCGCCTGCAGCTGGTGC GTTTTCGCCAATGGCGAGCCCAGCCTC
 GCCTGGCTTCATGTCGTCTCCAGGTTTCAGTGCTGCTTCTCCAGCGCACAGCCCAGCGTC
 TCCGTTGAGCCCAACGTCGCCTGCATACAGTCCAATGTCACCAGCGTACAGCCCCACGT
 CGCCGGCTTACAGCCCGACGTCACCGGCTTACAGTCCAACGTCGCCTGCATACTCG

20 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de
 RPII215 codificado por un ADN de *rpII215* de WCR ejemplar adicional, mencionado en la presente
 en algunos lugares como RPII215-3 de WCR:

ITRHGINRDDSGPLVRCSFEETVEILMDAAMFSEGDPLTGVSENVMLGQLAPLGTGLMDLVL
 DAKKLANAIEYEASEIQQVMRGLDNEWRS PDHGP GTPISTPFASTPGFTASSPFSPGGGAFSP
 25 AAGAFSPMASPASP GFMSSPGFSAASPAHSPASPLSPTSPAYSPMSPAYSPTSPAYSPTSPAYS
 PTSPAYS

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7 muestra un ADN de *rpII215* de WCR ejemplar, mencionado en
 la presente en algunos lugares como reg1 de *rpII215-1* (región 1) de WCR, que se usa en algunos
 ejemplos para la producción de un ARNdh:

GTGCTTATGGACGCTGCATCGCATGCCGAAAACGATCCTATGCGTGGTGTGTCGGAAAA
TATTATTATGGGACAGTTACCCAAGATGGGTACAGGTGTTTTGATCTCTTACTGGATGC
CGAAAAATGCAAGTATGGCATCGAAATACAGAGCAC

- 5 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8 muestra un ADN de *rpII215* de WCR ejemplar adicional, mencionado en la presente en algunos lugares como reg1 (región 1) de *rpII215-2* de WCR, que se usa en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

GACCCAATGAGAGGAGTATCTGAAAACATTATCCTCGGTCAACTACCAAGAATGGGCA
CAGGCTGCTTCGATCTTTTGCTGGACGCCGAAAATGTAAAATGGGAATTGCCATACCT
C

- 10 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9 muestra un ADN de *rpII215* de WCR ejemplar adicional, mencionado en la presente en algunos lugares como reg1 (región 1) de *rpII215-3* de WCR, que se usa en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

GACCCATTGACTGGTGTGTCTGAAAACGTGATGCTTGGTCAATTGGCTCCGCTCGGTAC
TGGTTTGATGGACCTTGTGTTGGATGCGAAGAAATTGGCAAACGCCATCGAG

- 15 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10 muestra una secuencia de nucleótidos del promotor de fago T7.
La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:11 muestra un fragmento de una secuencia codificante de *YFP* ejemplar.

- Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:12-19 muestran cebadores usados para amplificar porciones de secuencias de *rpII215* de WCR ejemplares que comprenden reg1 de *rpII215-1*, reg1 de *rpII215-2*, v1 de *rpII215-1*, v1 de *rpII215-2*, v2 de *rpII215-2*, y *rpII215-3*, usadas en algunos ejemplos para la
20 producción de ARNdh.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:20 muestra un gen de *YFP* ejemplar.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:21 muestra una secuencia de ADN de la región 1 de *anexina*.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:22 muestra una secuencia de ADN de la región 2 de *anexina*.

- 25 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:23 muestra una secuencia de ADN de la región 1 de *beta espectralina 2*.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:24 muestra una secuencia de ADN de la región 2 de *beta espectralina 2*.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:25 muestra una secuencia de ADN de la región 1 de *mtRP-L4*.

- 30 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:26 muestra una secuencia de ADN de la región 2 de *mtRP-L4*.

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:27-54 muestran cebadores usados para amplificar regiones de genes de *anexina*, *beta espectrina 2*, *mtRP-L4*, y *YFP* para la síntesis de ARNdh.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:55 muestra una secuencia de ADN de maíz que codifica una proteína tipo TIP41.

- 5 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:56 muestra la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido cebador T20VN.

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:57-61 muestran cebadores y sondas usados para los análisis de expresión del transcrito de ARNdh en maíz.

- 10 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:62 muestra una secuencia de nucleótidos de una porción de una región codificante de *SpecR* usada para la detección de la estructura principal del vector binario.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:63 muestra una secuencia de nucleótidos de una región codificante de *AAD1* usada para el análisis de la cantidad de copias genómicas.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:64 muestra una secuencia de ADN de un gen *invertasa* de maíz.

- 15 Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:65-73 muestran las secuencias de nucleótidos de oligonucleótidos de ADN usados para las determinaciones de la cantidad de copias de genes y la detección de la estructura principal del vector binario.

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:74-76 muestran cebadores y sondas usados para los análisis de expresión en maíz del transcrito de ARNdh.

- 20 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77 muestra un ADN de *rpII215* de BSB ejemplar, mencionado en la presente en algunos lugares como *rpII215-1* de BSB:

TTTGACCATGGTTAAGGCAGGTTAGCCTTCTTGAATTGTGTTGGCTTCTTTCTGGTGTCC
AATCTAATTTAAAATTTAAAATGGTCAAGGAATTGTACCGTGAGACGGCTATGGCCCGT
AAAATATCCCATGTTAGTTTTGGGTTAGACGGGCTCAACAAATGCAGCAGCAGGCTCA
TTTGCATGTCGTTGCTAAAACTTATATTCTCAGGACTCTCAGAGAACTCCTGTTTCCTTA
25 TGGAGTTTTAGATAGAAAAATGGGCACAAATCAAAAAGATGCAAATTGTGGTACTTGT
GGTAAAGGATTAAATGACTGTATTGGACACTATGGGTACATAGATCTTCAGCTGCCAGT
GTTTCATATTGGTTATTTTAGGGCAGTCATAAATATTTTACAGACAATATGTAAGAATCC
TCTATGTGCAAGAGTTTTGATTCCTGAGAAAGAAAGACAAGTTTATTATAATAAGTTGA
GGAATAAAAATTTGTCTTACTTAGTTAGGAAAGCTTTGAGAAAACAAATACAACTAGA
30 GCGAAAAAGTTTAATGTTTGCCACATTGTGGTGATTAAATGGCTCCGTTAAGAAATG
TGGACTTCTGAAGATTATACATGAAAAACATAACAGTAAAAAGCCTGATGTAGTAATGC

AGAATGTATTAGCTGAATTAAGTAAAGATACAGAGTATGGCAAAGAATTAGCTGGTGT
 AAGTCCGACTGGGCACATCCTAAATCCTCAAGAGGTCCTACGACTATTGGAAGCTATCC
 CATCTCAAGATATTCCATTACTTGTTATGAATTATAATCTTTCAAACCTGCTGATCTGA
 TACTGACCAGGATTCCAGTTCCTCCATTATCTATCCGACCCTCAGTTATATCTGATTGGA
 5 AATCTGGAACAAATGAAGATGATCTTACCATGAACTATCAGAAATAGTCTTTATTAAT
 GATGTCATCATGAAACATAAACTTTCTGGAGCTAAGGCACAAATGATTGCAGAAGATTG
 GGAGTTCTTACAGTTACATTGTGCTCTTTACATAAATAGTGAGACATCTGGAATACCAAT
 TAACATGCAGCCAAAAAATCCAGTAGAGGATTAGTTCAAAGACTAAAAGGTAAACAT
 GGTAGGTTCGGTGGAAATCTATCTGGAAAACGAGTTGATTTCTCTGCACGTACTGTCATT
 10 TCACCTGATCCTAATCTTAGGATTGAAGAGGTTGGTGTTCCTATTCATGTTGCTAAAATC
 TTAACATTTCTGAAAGAGTTCAACCTGCCAATAAAGAAGTCTTTGAGGCGATTGGTTTGT
 AATGGACCTGATGTACATCCTGGTGCTAATTTTGTTCAACAGAAGGGACAATCATTTAA
 AAAATTTCTTAGATATGGTAATCGAGCAAAAATAGCACAAGAATTAAAGGAAGGTGAT
 ATTGTAGAAAGGCACCTAAGGGATGGAGATATAGTTCTATTCAATCGTCAGCCTAGTTT
 15 ACACAAGCTGAGTATAATGTCACATCGTGTACGAGTACTAGAGAATAGAACATTTAGGT
 TCAATGAATGTGCCTGTACTCCATACAATGCTGATTTTGATGGCGATGAAATGAATCTTC
 ATGTACCACAGTCGATGGAACTCGAGCAGAAGTTGAAAATCTTCACGTTACTCCACGA
 CAAATCATTACCCACAGTCAAATAAACCCGTTATGGGTATTGTACAGGACACTCTCAC
 TGCTGTCAGAAAAATGACAAAAAGGGATGTTTTCTTAGAAAAGGAACAAATGATGAAC
 20 ATTCTCATGCATTTGCCAGGCTGGAATGGAAGAATGCCGATTCCAGCGATTCTGAAACC
 AAAACCTTTGTGGACAGGTAAACAAGTATTCTCGTTGATTATCCCCGGTGAAGTTAACA
 TGATTCGAACCTCACTCTACACATCCCGATGATGAAGATAACGGCCCTTACAAATGGATC
 TCTCCTGGTGACACCAAGGTAATGGTGGAAGCTGGAAAATTGGTCATGGGAATTCTCTG
 TAAAAAGACTCTTGGTACATCAGCTGGTTCTTTGCTTCACATCTGTTTTTTGGAACTCGG
 25 TCATGAACAGTGTGGCTATTTTTATGGTAACATTCAAAGTGTGTTAACAAGTGGCTATT
 GTTGGAGGGTCACTCCATCGGTATTGGTGACACTATTGCTGATCCTCAGACATATCTTGA
 AATTCAGAAAGCAATTAAAAAAGCCAAACAGGATGTCATAGAGGTTATTCAAAAAGCT
 CACAACATGGACCTGGAACCTACGCCTGGTAATACTTTGAGGCAGACTTTCGAAAATCA
 GGTAACAGAAATTCTAAACGACGCTCGAGACAAAAGTGGAGGTTCTGCTAAGAAATCT
 30 CTTACTGAATACAATAACCTAAAGGCTATGGTGGTGTCTGGTTCAAAGGGTCCAACAT
 TAATATTTCTCAGGTTATTGCTTGTGTGGGTCAGCAAAACGTAGAAGGTAAGCGAATCC

CATTTCGGCTTCAGGAAGAGGACATTACCCCATTTTCATCAAGGATGATTACGGTCCTGAG
 TCTAGAGGATTCGTAGAAAACCTCGTACCTTGCCGGTCTGACTCCTTCCGAGTTCTTCTTC
 CACGCTATGGGAGGTAGAGAAGGTCTTATTGATACTGCTGTCAAACTGCTGAAACAGG
 TTATATCCAGCGTCGTCTTATAAAGGCTATGGAGAGCGTTATGGTCCATTACGATGGTA
 5 CCGTCAGAAATTCTGTTGGACAGCTCATTTCAGTTGAGGTATGGAGAGGACGGCCTTTGT
 GGTGAAGCAGTCGAGTTTCAGAAGATACAGAGTGTTCTCTTTCTAACAGGAAGTTCGA
 AAGCACATTCAAATTTGATCCATCGAATGAAAGGTACCTCCGTAAAATCTTCGCTGAAG
 ATGTTCTTCGTGAGTTACTCGGCTCTGGTGAAGTTATATCTGCTCTCGAACAGGAATGGG
 AACAATTGAACAGGGATAGGGATGCCCTGAGGCAGATTTTCCCTTCAGGAGAGAACAA
 10 AGTTGTACTCCCTTGTAACCTGAAGAGGATGATATGGAACGCTCAGAAGACTTTCAAGA
 TCAATCTCAGGGCTCCGACCGATCTCAGTCCGCTCAAAGTCATTTCAGGGTGTGAAAGAG
 CTATTAGAGAAGTGTGTGATTGTGCGCCGGTGACGATCATTTAAGCAAACAGGCTAATGA
 AAACGCTACCCTCCTTTTCCAATGTTTGGTTAGGAGTACCCTCTGTACAAAGCTAGTTTC
 AGAGAAGTTCAGGCTTTCATCGGCAGCTTTTGAGTGGCTTATAGGAGAAATCGAAACAA
 15 GATTTAAACAAGCCCAGGCTGCTCCAGGTGAAATGGTTGGAGCTTTGGCAGCCCAGAGT
 TTGGGAGAACCGGCCACTCAGATGACACTCAACACTTTCCATTTTGCTGGTGTGTCATC
 GAAAAACGTAACCCTTGGTGTGCCCAGGCTAAAGGAAATCATCAATATAAGTAAGAAA
 CCAAAGGCTCCATCTCTTACCGTCTTCCTTACCGGAGCAGCTGCCAGAGATGCTGAAAA
 GGCTAAAAATGTTCTGTGCCGTCTTGAACACACAACGCTAAGGAAGGTAACGGCTAATA
 20 CTGCAATTTACTATGATCCTGATCCACAAAACACGGTAATCCCAGAGGATCAAGAGTTT
 GTTAATGTATACTATGAAATGCCTGACTTTGATCCTACCAGAATTTACCCTGGCTGTTG
 AGAATTGAATTGGACAGAAAAAGAATGACAGATAAGAAACTGACGATGGAACAGATAT
 CTGAAAAAATCAATGCTGGTTTCGGTGATGATTTAAATTGTATTTTCAATGACGACAAT
 GCTGAAAAGCTTGTATTACGTATTAGGATCATGAACAGCGATGACGGGAAATCGGGAG
 25 AAGAGGAAGAATCAGTTGACAAGATGGAAGACGATATGTTCTTAGGTGTATTGAAGC
 TAACATGCTTTTCAGACATGACTTTACAGGGTATTGAAGCTATCAGCAAGGTATATATGC
 ACTTGCCTCAAACCTGACTCAAAGAAAAGAATCATAATGACTGAAACAGGAGAGTTCAA
 AGCCATTGCTGATTGGTTGCTTGAAACTGACGGTACATCTCTTATGAAAGTACTTAGTGA
 AAGAGATGTCGATCCTGTGCGTACATTCTCTAACGACATTTGTGAAATTTTCTCTGTGCT
 30 GGGTATCGAGGCTGTCCGTAAATCGGTAGAGAAAGAAATGAACAATGTATTGCAGTTCT
 ATGGATTGTACGTAAACTACCGACATTTGGCTTTGCTTTGTGACGTAATGACTGCCAAG

GGTCATCTTATGGCCATCACTAGGCACGGTATCAACAGGCAGGACACCGGAGCTCTCAT
GAGATGCTCTTTTGAAGAACTGTTGATGTGCTCATGGATGCAGCATCTCACGCTGAGG
TAGATCCCATGAGAGGAGTGTGAGAGAACATCATCATGGGTCAATTGCCGAGGATGGG
AACTGGCTGCTTTGACTTATTGTTGGATGCTGAGAAATGTAAAGAGGGGCATAGAAATCT
5 CCATGACTGGAGGTGCTGACGGTGCTTACTTCGGTGGTGGTTCACACCACAGACATCG
CCTTCTCGTACTCCTTGGTCTTCAGGTGCTACTCCCGCATCAGCTTCATCATGGTCACCT
GGTGGAGGTTCTTCAGCTTGGAGCCACGATCAGCCTATGTTCTCACCTTCTACTGGTAGC
GAACCCAGTTTTTCTCCCTCATGGAGCCCTGCACACAGTGGATCTTCTCCGTCATCATAT
ATGTCTTCTCCCGCTGGAGGAATGTCTCCAATTTACTCACCGACTCCCATATTCGGACCA
10 AGCTCGCCATCGGCTACCCCAACTTCTCCTGTCTATGGTCCAGCCTCCCCTCCGTCTTAC
TCCCCTACTACTCCTCAATACCTTCCAACGTCTCCTTCCTATTCTCCAACCTTCACCTTCTT
ATTCTCCTACATCTCCTTCCTACTCTCCTACTTCCCCTTCTTATTCACCAACTTCTCCTTCC
TATTCACCAACATCTCCTTCCTACTCCCCAACATCACCTCATATTCACCTACATCCCCTT
CATATTCTCCAACATCTCCATCCTATTCCCCTACTTCTCCATCATATTCGCCTACATCTCC
15 CTCTTACTCTCCAACCTTCACCATCCTATTCTCCTACCTCCCCTTCTTACTCACCAACATCA
CCGTCTTACTCGCCAAGTTCTCCAAGCAATGCTGCTTCCCCAACATACTCTCCTACTTCA
CCTTCATATTCCCCGACTTCACCACATTATTCGCCTACTTCACCTTCTTATTCACCTACTT
CTCCCCAATATTCTCCAACAAGCCCCAGCTACAGCAGCTCGCCGCATTATCATCCCTCAT
CCCCTCATTACACACCTACTTCTCCCAACTATTCCCCCACTTCTCCGTCTTATTCTCCATC
20 ATCACCTTCATACTCCCCATCCTCCCCAAAACACTACTCACCCACCTCTCCTACATATTC
ACCAACCTCCCCTGCTTATTCACCACAATCGGCTACCAGCCCTCAGTATTCTCCATCCAG
CTCAAGATATTCCCCAAGCAGCCCAATTTATACCCCAACCCAATCCCATTATTCACCTGC
TTCAACAAATTATTCTCCAGGCTCTGGTTCCAATTATTCCCCGACATCTCCCACCTATTC
ACCTACATTTGGTGATACCAATGATCAACAGCAGCAGCGATAAGTGTTGAATTTGTATA
25 TATTTTACTTATGATTTTTCATTTTATGAATGTATATTTCTTATATTTGAATTGACAATGAC
TCAATTATAAACATTATCATCCTAATGTCTGTTAAAGTTTATTGTTGATAGTTTTCTTCCT
TTTTTTTTTTTTTACAGGACTGTTCTTTTTTAACAAATTTACCTTCTGAGCTGAAGCATC
TCCTTTATTATTGATAGAGGGAATACCAGAATTGCCTGTCATTTCCATTACTTCCTCTTTA
GCATAACGATGGACTGTTATATCTTTCAACCACCATGGATCTCATTCCTTGTCAAAAGTT
30 AAATCCTCTTTCAAGGAACTGTTTTTATAGGATTTAAACTATTGCTGACATTTTTTTTATT

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de RPII215 de BSB codificado por un ADN de *rpII215* de BSB ejemplar (es decir, *rpII215-1* de BSB):

MVKELYRETAMARKISHVSFGLDGPQQMQQQAHLHVVAKNLYSQDSQRTVPVYGVLD RK
MGTNQKDANCGTCGKGLNDCIGHYGYIDLQLPVFHIGYFRAVINILQTICKNPLCARVLIPE
5 KERQVYYNKL RNKNLSYLVRKALRKQIQTRAKKFNVCPHCGDLNGSVKKCGLLKIIHEKH
NSKKPDVVMQNVLAELSKDTEYGKELAGVSPTGHILNPQEVRLLEAIPSQDIPLLMNYNL
SKPADLILTRIPVPLSIRPSVISDLKSGTNEDDLTMKLSEIVFINDVIMKHKLSGAKAQMIAED
WEFLQLHCALYINSETSGIPINMQPKKSSRGLVQRLKGKHGRFRGNLSGKRVD FSARTVISP
DPNLRIEEVGVPIHVAKILTFPERVQ PANKELLRRLVCNGPDVHPGANFVQQKGQSFKKFLR
10 YGNRAKIAQELKEGDIVERHLRDGDIVLFNRQPSLHKLSIMSHRVRVLENRTFRFNECACTP
YNADFDGDEMNLHVPQSMETRAEVENLHVTPRQIITPQSNKPVMGIVQDTLTA VRKMTKR
DVFLEKEQMMNILMHLPGWNGRMPPIAILKPKPLWTGKQVFSLIIPGEVNMIRTHSTHPDDE
DNGPYKWISPGDTKVMVEAGKLVMGILCKKTLGTSAGSLLHICFLELGHEQCGYFYGNIQT
VVNNWLLLEGHSIGIGDTIADPQTYLEIQKAIKKAKQDVIEVIQKAHNMDLEPTPGNTLRQT
15 FENQVNRILNDARDKTGGS AKKSLTEYNNLKAMVVSGSKGSNINISQVIACVGQQNVEGKR
IPFGFRKRTLPHFIKDDYG PESRGFVENSYLAGLTPSEFFFHAMGGREGLIDTAVKTAETGYI
QRRLIKAMESVMVHYDGTVRNSVGQLIQLRYGEDGLCGEAVEFQKIQSVPLSNRK FESTFK
FDPSNERYLRKIFAEDVLRELLGSGEVISALEQEWEQLNRDRDALRQIFPSGENKVVLPCNL
KRMIWNAQKTFKINLRAPTDL SPLKVIQGVKELLEKCVIVAGDDHLSKQANENATLLFQCL
20 VRSTLCTKL VSEKFRLSSAAFEWLIGEIETRFKQAQAAPGEMVGALAAQSLGEPATQMTLNT
FHFAGVSSKNVTLGVPRLKEIINISKKPKAPSLTVFLTGAAARDAEKAKNVLCRLEHTTLRK
VTANTAIYYDPDPQNTVIPEDQEFVNVYYEMPDPDFPTRISPWLLRIELDRKRMTDKKLTMEQ
ISEKINAGFGDDLNCIFND DNAEKLVLIRIMNSDDGKSGEEESVDKMEDDMFLRCIEANM
LSDMTLQGIEAISKVYMHL PQTDSKKRIIMTETGEFKA IADWLLETDGTSLMKVL SERD VDP
25 VRTFSNDICEIFSVLGIEAVRKSVEKEMNNVLQFYGLYVNYRHLALLCDVMTAKGHLMAIT
RHGINRQDTGALMRCSFEETVDV LMDAASHAEVDPMRGVSENIIMGQLPRMG TGCFD LLL
DAEKCKEGIEISMTGGADGAYFGGGSTPQTSPSRTPWSSGATPASASSWSPGGGSSAWSHD
QPMFSPSTGSEPSFSPSWSPA HSGSSPSSYMSSPAGGMSP IYSPTPIFGPSSPSATPTSPVYGPAS
PPSYSPTTPQYLPTSPSYSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSYS
30 PTSPSYSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSYSPTSPHY
SPTSPSYSPTSPQYSPTSPSYSSSPHYHPSSPHYTPTSPNYSPTSPSYSPSSPSYSPSSPKHYSPTS

PTYSPTSPAYSPQSATSPQYSPSSSRYSPSSPIYTPTQSHYSPASTNYSPGSGSNYSPTSPTYSPT
FGDTNDQQQQR

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79 muestra un ADN de *rpII215* de BSB ejemplar, mencionado en la presente en algunos lugares como *rpII215-2* de BSB:

5 GTGCCTTCTTCAGTCGCCAGCTTGCTTTCATCAGTTTAAGCAAGCCAGTAAAATGGCGA
CTAACGATTCTGAAGGCACCTATTCGTCAAGTGAAGAGAGTACAGTTTGGAATCCTTTCT
CCAGATGAAATTCGACGGATGTCAGTTACAGAAGGGGGAATTCGTTTCCCCGAGACAAT
GGAAGGAGGACGTCCAAAACCTCGGGGGTCTCATGGATCCCCGACAAGGCGTCATCGAT
AGAATGTCTCGCTGCCAAACTTGCGCAGGAAATATGTCAGAATGTCCTGGGCATTTTGG
10 ACACATAGATTTAGCAAAAACCAGTATTTTCATATTGGTTTCATTACAAAGACTATTAAAA
TACTCCGATGCGTGTGCTTTTATTGCTCAAAACTGTTGGTTAGCCCTAGTCATCCTAAAA
TTAAGGAAATCGTTCTGAAATCAAAAGGTCAGCCTAGAAAAAGACTTACTTTTGTCTAT
GATTTATGCAAAGGTAAAAATATTTGTGAAGGCGGTGACGAAATGGATATACAGAAAG
ATAATATGGATGAGAATGCTTCAAATCGAAAACCTGGTCACGGTGGTTGTGGTCGTTAC
15 CAACCAAATCTACGTCGTGCAGGTTTGGACGTAACAGCTGAATGGAAGCACGTCAATG
AAGATGGTCAAGAAAAGAAAATAGCCTTGACTGCTGAACGTGTTTGGGAAATATTAAA
ACACATAACAGATGAAGAGTGTTTTATCTTGGGTATGGACCCAAAGTTCGCTCGACCCG
ATTGGATGATTGTCACTGTACTTCCTGTTCCACCCCTTTGCGTAAGGCCTGCAGTCGTTA
TGTATGGCTCTGCAAGAAATCAGGACGATTTGACACATAAGCTAGCCGATATTATAAAG
20 TGTAACAATGAGCTCCAGCGTAATGAACAATCAGGAGCGGCCACACATGTTATTGCAG
AAAATATTAAAATGCTTCAGTTCCACGTCGCTACCTTGGTTGATAATGATATGCCAGGC
CTTCCAAGAGCAATGCAAAAATCTGGAAAACCACTGAAAGCTATCAAAGCTAGATTAA
AAGGCAAGGAAGGTCGTATTAGAGGTAATCTTATGGGTAAGCGTGTTGACTTCTCCGCT
CGTACTGTTATTACGCCAGATCCTAATTTACGTATTGATCAGGTCGGTGTACCTCGATCT
25 ATTGCACTTAACATGACTTTCCCCGAAATCGTCACTCCATTCAATATTGACAAAATGTTA
GAGTTGGTAAGGAGAGGAAATGCTCAGTACCCTGGTGCTAAGTACATTGTCCGTGACAA
TGGTGAACGTATTGACCTTAGATTTTCATCCCAAACCATCAGATCTCCATTTACAGTGGG
GTTATAAAGTTGAACGACACATTCGTGATGGAGATCTTGTTATTTTCAATCGACAGCCC
ACTCTACACAAAATGAGTATGATGGGTCACAGGGTCAAAGTTCTTCCGTGGTCAACTTT
30 CAGGATGAATCTCAGTTGTACGTCACCTTACAATGCTGATTTTGATGGCGATGAAATGA
ATCTTCATCTTCCGCAGACAGAAGAGGCTAGGGCTGAAGCATTATTTTGATGGGCAAC

AAAGCAAACCTTAGTGACTCCTAGAAATGGAGAACTGTTGATTGCTGCGACTCAAGACTT
 CATCACTGGTGCCTACCTTCTCACGCAAAGGAGTGTTTTCTTTACCAAGAGGGAGGCTT
 GTCAATTGGCTGCTACTCTTCTGTGTGGAGATGATATTAATATGACCATTAATCTACCAA
 AACCAGCCATAATGAAGCCAGCAAAGTTGTGGACCGGAAAACAGATCTTCAGCTTGCTT
 5 ATTAAACCAAACAAATGGTGTCTATCAATGCCAATCTAAGGACGAAAGGGAGAGCTT
 ACACAAGTGGTGAAGAAATGTGCATTAATGATTCTTTCATCAACATTCGCAATTCGCAA
 CTACTAGCTGGTGTGATGGATAAATCAACCCTCGGATCTGGCGGTAAAGCGAATATATT
 TTATGTGCTCCTATGCGACTGGGGTGAAGAGGCTGCCACAACCTGCGATGTGGAGGCTCA
 GCCGTATGACTTCAGCTTACCTTATGAATCGTGGTTTTTCTATTGGAATTGGAGATGTTA
 10 CACCAAGTCCTCGACTTCTGCACCTTAAACAGGAATTGTTAAATGCTGGCTATACAAAA
 TGTAATGAGTTTATACAGAAGCAGGCCGACGGTAAACTTCAATGCCAGCCAGGTTGTTC
 TGCAGATGAAACTCTTGAAGCTGTAATTCTCAAAGAACTTTCAGTTATCCGAGACAGGG
 CAGGGAAAGCCTGTCTCAACGAGTTGGGAAGCCAAAATAGTCCGCTTATCATGGCTCTC
 GCAGGGTCCAAAGGATCATTTATTAACATATCGCAGATGATTGCCTGTGTAGGCCAACA
 15 AGCCATAAGTGGAAGCGTGTGCCTAATGGTTTTGAAGACAGAGCTCTCCCTCATTACG
 AACGTCACTCAAAAATTCAGCAGCTAAAGGATTTGTAGAAAATAGTTTCTTTTCTGGC
 CTCACCCCTACAGAGTTCTTCTTCCACACAATGGGTGGTAGAGAAGGTCTTGTAGATAC
 CGCAGTTAAAACTGCAGAAACGGGTATATGCAGAGGCGATTGGTGAAGTCATTAGAA
 GACCTCTGCCTCCATTATGATATGACTGTTAGAAATTCTACCGGAGATGTTATTAGTTT
 20 GTGTATGGTGGTGTGATGGCCTGGACCCTACCTATATGGAAGGAAATGGTTGTCCTGTTGA
 ACTGAAGAGGGTATGGGATGGTGTACGAGCTAACTACCCTTTCCAGCAGGAAAAGCCA
 TTAAGTTATGATGATGTCATCGAAGGTTTCAGATGTTTTATTAGATTCATCTGAGTTCAGT
 TGTTGCAGCCATGAATTCAAAGAACAATTGAGGTCATTTGTCAAAGATCAGGCGAAGA
 AATGTTTAGAAATTCAGACAGGATGGGAAAAGAAATCTCCACTTATCAGCGAGCTGGA
 25 AAGGGTCACCTTGTCCCAGCTGATACACTTCTTCCAGACTTGTCCGGGAAAAATATCTTA
 ATGCGAAAATCGAACCAGGTACTGCTGTTGGAGCCTTAGCTGCACAAAGTATTGGTGAG
 CCAGGTACTCAAATGACCCTCAAGACTTTTCACTTTGCTGGAGTTGCTTCGATGAATATT
 ACTCAGGGTGTACCAAGAATAAAGGAAATTATCAACGCTAGTAAAAACATCAGTACCC
 CAATTATTACTGCTTATTTAGAGAATGATACCGACCCTGAATTTGCTCGGCAGGTAAAA
 30 GGGAGGATAGAGAAAACCTACTCTTGGAGAAGTAACTGAATACATTGAAGAGGTTTATG
 TTCCTACTGACTGTTTCCTAATTATTAAGTTGGATGTTGAAAGGATTCGCCTTTTAAAGT

TGGAAGTAAATGCAGACAGTATTAAGTACAGTATTTGTACATCAAAATTAAAAATAAA
 GAACCTGCAAGTACTCGTCCAACTTCATCCGTTCTAACCGTGAATACTCAAGCGGGAA
 AGGATACATTAGATGGATCTCTTAGGTACCTGAAAGAAAATCTTCTCAAAGTTGTTATT
 AAGGGAGTACCAAACGTTAATAGAGCAGTCATACACGAAGAAGAAGATGCTGGTGTTA
 5 AGAGGTATAAACTCCTTGTTGAAGGTGATAACTTGAGAGATGTGATGGCCACCAGAGGT
 ATAAAGGGTACTAAGTGCACCTTCAAATAATACATATCAGGTCTTTTCTACTCTTGGAATT
 GAAGCTGCAAGGTCTACAATAATGTCAGAAATAAACTTGTTATGGAAAACCACGGTA
 TGTCTATAGACCATAGGCATCCAATGTTGGTAGCTGATCTTATGACATGCAGAGGAGAG
 GTCCTCGGAATCACTAGGCAGGGTCTTGCGAAAATGAAGGAATCTGTCCTTAACCTAGC
 10 TTCGTTTGAAAAAACTGCTGATCATCTATTTGACGCAGCATATTATGGTCAAACCTGATGC
 TATTACTGGTGTATCGGAGTCAATAATAATGGGGATACCAATGCAGATTGGAACAGGCC
 TTTTAAACTTCTTCACAGATATCCTTTTTTTATACTGTTTTTAATTTTATAGATATTTT
 GTTGTAGGAGGGTTAATAATGAAGAGGCAATGTGTAGTAGTTTCGATGAATATTGCTAC
 TATCAGAAGCTGTTACTCTGAAGTATCGTCCACTTACTATATCCTCCCTATTTTTTAAAA
 15 ACAAATTTGTCTTGACCATTTATACTGTTTTTCATGGCATAAAATTTAAGGGTATGAATTTT
 TAATCCACGTGTGTTTTTTAATAAGGTTCTTGAGGTACAAACGATAAATAATGATGATTG
 ATAATCATGCCCAAAGTGAAAAAACAGGATACAATAAAATTATAGAAGTTATACAGG
 TTATTTAAAAACATAAAGTTAGCTACAATATTAATACATAACTACATGTGTTAGAATAA
 TTAAATACGTATAATTACAAAATATGGAGGAGTAAAATACTACTTAGAATGTTACTGGT
 20 GGATATGCTATTAGATCTTCTGATCTACTCAATAACCTCAAGAACCTTATTAAGATCTA
 ATAGTAACAGTCTAGAAATTATCCATATATATATGTAACTTTTAATCTTCTTAGGCGAA
 AGGGCAAATGTGATATCATAAACTTGAAATGGTCTGGGGTGACCTTAACCAAGATCTT
 GTGTGTGTCATATATATATATATATGAAGTGGTCTGGTCAGTTTAAAATTCATGCTAAT
 TATAACAAAATTTAATGATACTTTAATAAGATTTTACAATAATATCTTAAAAACCCTGG
 25 ATTTTCAAACACCCTTACTACAGAAAAGGGTTATTGCACAACACATAAAAAATATTTT
 TAGTGCCAACTAGAAAGAGATCTAAAAGAGGGATTCACTGGTAAATGTATCATAAATC
 CTTGCCAGAAACATTTACCAGGTGACATCACAAATAAATTGGACGGCATTTAGCAGAA
 GGGAA

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:80 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de
 30 RPII215 de BSB adicional codificado por un ADN de *rplI215* de BSB ejemplar (es decir, *rplI215-2*
 de BSB):

MATNDSKAPIRQVKRVQFGILSPDEIRMSVTEGGIRFPETMEGGRPKLGGLMDPRQGVIDR
 MSRCQTCAGNMSECPGHFGHIDLAKPVFHIGFITKTIKILRCVCFYCSKLLVSPSHPKIKEIVL
 KSKGQPRKRLTFVYDLCKGKNICEGGDEMDIQKDNMDENASNRKPGHGGCGRYQPNLRR
 AGLDVTAEWKHVNEDGQEKKIALTAERVWEILKHITDEECFILGMDPKFARPDWMIVTVLP
 5 VPPLCVRPAVVMYGSARNQDDLTHKLADIICNNELQRNEQSGAATHVIAENIKMLQFHVA
 TLVDNDMPGLPRAMQKSGKPLKAIKARLKKGKEGRIRGNLMGKRVDIFSARTVITPDPNLRID
 QVGVPRSIALNMTFPEIVTPFNIDKMLELVRRGNAQYPGAKYIVRDNGERIDLRFHHPKPSDL
 HLQWGYKVERHIRDGD LVIFNRQPTLHKMSMMGHRVKVLPWSTFRMNLSTSPYNADFD
 GDEMNLHLPQTEEARAEALILMGNKANLVTPRNGELLIAATQDFITGAYLLTQRSVFFTKRE
 10 ACQLAATLLCGDDINMTINLPKPAIMKPAKLWTGKQIFSLLIKPNKWCPINANLRTKGRAYT
 SGEEMCINDSFNIRNSQLLAGVMDKSTLGSGGKANIFYVLLCDWGEEAATTAMWRLSRMT
 SAYLMNRGFSIGIGDVTPSPRLLHLKQELLNAGYTKCNEFIQKQADGKLQCQPGCSADETLE
 AVILKELSVIRDRAGKACLNELGSQNSPLIMALAGSKGSFINISQMIACVGQQAISGKRVPNG
 FEDERALPHYERHSKIPAAKGFVENSFFSGLTPTEFFFTMTGGREGLVDTAVKTAETGYMQR
 15 RL VKSLEDLCLHYDMTVRNSTGDVIQFVYGGDGLDPTYMEGNGCPVELKRVWDGVRANY
 PFQQEKPLSYDDVIEGSDVLLDSSEFSCCSHEFKEQLRSFVKDQAKKCLEIQTGWEKKSP LIS
 ELERVTLSQLIHFFQTCREKYLNAKIEPGTAVGALAAQSIGEPGTQMTLKTFFHAGVASMNI
 TQGVPRIKEIINASKNISTPIITAYLENDTDPEFARQVKGRIEKTTLGEVTEYIEEVYVPTDCFLI
 IKLDVERIRLLKLEVNADSIKYSICTSKLKIKNLQVLVQTSSVLT VNTQAGKDTLDGSLRYLK
 20 ENLLKVVIKGVPNVNRAVIHEEEDAGVKRYKLLVEGDNL RDVMATRGIKGTKCTSNNTYQ
 VFSTLGIEAARSTIMSEIKLVMENHGMSIDHRHPMLVADLMTCRGEVLGITRQGLAKMKES
 VLNLASFECTADHLFDAAYYGQTDAITGVSESIIMGIPMQIGTGLFKLLHRYPPFFILFLIFRYFS
 VVGGLIMKRQCVVSMNIATIRSCYSEVSSTYYILPIF

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81 muestra un ADN de *rpII215* de BSB ejemplar, mencionado en
 25 la presente en algunos lugares como *rpII215-3* de BSB:

CGGACATCATCAAGTCCAACACTTACCTTAAGAAGTACGAGCTGGAAGGGGCACCAGG
 GCACATCATCCGTGACTACGAACAACCTCCTCCAGTTCCACATTGCGACTTTAATCGACA
 ATGACATCAGTGGACAGCCACAGGCCCTCCAAAAGAGTGGCAGGCCTTTGAAGTCGAT
 CTCTGCCCCGTCTCAAGGGGAAGGAAGGGCGAGTCAGGGGGAATCTCATGGGGAAGAGA
 30 GTAGACTTCAGTGCCAGGGCGGTGATAACAGCAGACGCCAACATCTCCCTTGAGGAAG
 TGGGAGTCCCAGTGGAAGTCGCCAAGATACACACCTTCCCCGAGAAGATCACGCCTTTC

AACGCCGAGAAATTAGAGAGGCTCGTGGCCAATGGCCCTAACGAATACCCAGGAGCAA
ATTATGTGATCAGAACAGATGGACAGCGAATAGATCTCAACTTCAACAGGGGGGATAT
CAAAC TAGAAGAAGGGTACGTCGTAGAGAGACACATGCAGGATGGAGACATTGTACTG
TTCAACAGACAGCCCTCTCTCCACAAAATGTTCGATGATGGGACACAAAGTGCCTGTGAT
5 GTCGGGGAAGACCTTTAGATTAAATTTGAGTGTGACCTCCCCGTACAATGCGGATTTTG
ATGGAGACGAGATGAATCTCCACATGCCCCAGAGTTACAAC TCCATAGCCGAAC TGG
GGAGATCTGCATGGTCCCTAAGCAAATCCTTGGACCCCAGAGCAACAAGCCCGTCATGG
GGATTGTCCAAGACACACTCACTGGCTTAAGATTCTTCACAATGAGAGACGCCTTCTTT
GACAGGGGCGAGATGATGCAGATTCTGTACTCCATCGACTTGGACAAGTACAATGACAT
10 CGGACTAGACACAGTCACAAAAGAAGGAAAGAAGTTGGATGTTAAGTCCAAGGAGTAC
AGCCTTATGCGACTCCTAGAGACACCAGCCATAGAAAAGCCCAAACAGCTCTGGACAG
GGAAACAGATCTTAAGCTTCATCTTCCCCAATGTTTTCTACCAGGCCTCTTCCAACGAGA
GTCTGGAAAATGACAGGGAGAATCTGTTCGGACACTTGTGTTGTGATTTGTGGGGGGGAG
ATAATGTCGGGAATAATCGACAAGAGGG

15 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:82 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de RPII215 de BSB adicional codificado por un ADN de *rpII215* de BSB ejemplar (es decir, *rpII215-3* de BSB):

DIKSNTYLKKYELEGAPGHIIRDYEQLLQFHIALIDNDISGQPQALQKSGRPLKSISARLKG
KEGRVRGNLMGKRVD FSARAVITADANISLEEVGVPEVAKIHTFPEKITPFNAEKLRLVA
20 NGPNEYPGANYVIRTDGQRIDLNFNRGDIKLEEGYVVERHMQDGDIVLFNRQPSLHKMSM
MGHKVRVMSGKTFRLNLSVTSPYNADFDGDEMNLHMPQSYNSIAELEEICMVPKQILGPQS
NKPVMGIVQD TLTGLRFFTMRDAFFDRGEMMQILYSIDLKYN DIGLDTVTKEGKKLDVKS
KEYSLMRLLET PAIEKPKQLWTGKQILSFIFPNV FYQASSNESLENDRENLS DTCVVICGGEI
MSGIIDKR

25 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83 muestra un ADN de *rpII215* de BSB ejemplar, mencionado en la presente en algunos lugares como reg1 (región 1) de BSB_ *rpII215-1*, que se usa en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

GCCCAGGCTGCTCCAGGTGAAATGGTTGGAGCTTTGGCAGCCCAGAGTTTGGGAGAACC
GGCCACTCAGATGACACTCAACACTTTCCATTTTGCTGGTGTGTCATCGAAAAACGTAA
30 CCCTTGGTGTGCCAGGCTAAAGGAAATCATCAATATAAGTAAGAAACCAAAGGCTCC
ATCTCTTACCGTCTTCCTTACCGGAGCAGCTGCCAGAGATGCTGAAAAGGCTAAAAATG

TTCTGTGCCGTCTTGAACACACAACGCTAAGGAAGGTAACGGCTAATACTGCAATTTAC
TATGATCCTGATCCACAAAACACGGTAATCCCAGAGGATCAAGAGTTTGTTAATGTATA
CTATGAAATGCCTGACTTTGATCCTACCAGAATTTACCCTGGCTGTTGAGAATTGAATT
GGACAGAAAAAGAATGACAGATAAGAACTGACGATGGAACAGATATCTGAAAAAAT
5 CAATGCTGGTTTCGGTGATG

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:84 muestra un ADN de *rpII215* de BSB ejemplar adicional, mencionado en la presente en algunos lugares como reg1 (región 1) de BSB_*rpII215-2*, que se usa en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

GTGCCTTCTTCAGTCGCCAGCTTGCTTTCATCAGTTTAAGCAAGCCAGTAAAATGGCGA
10 CTAACGATTCGAAGGCACCTATTCGTCAAGTGAAGAGAGTACAGTTTGGAATCCTTTCT
CCAGATGAAATTCGACGGATGTCAGTTACAGAAGGGGGAATTCGTTTCCCGAGACAAT
GGAAGGAGGACGTCCAAAACCTCGGGGGTCTCATGGATCCCCGACAAGGCGTCATCGAT
AGAATGTCTCGCTGCCAACTTGCGCAGGAAATATGTCAGAATGTCCTGGGCATTTTGG
ACACATAGATTTAGCAAAACCAGTATTTTCATATTGGTTTCATTACAAAGACTATTAAAA
15 TACTCCGATGCGTGTG

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85 muestra un ADN de *rpII215* de BSB ejemplar adicional, mencionado en la presente en algunos lugares como reg1 (región 1) de BSB_*rpII215-3*, que se usa en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

CCAGGAGCAAATTATGTGATCAGAACAGATGGACAGCGAATAGATCTCAACTTCAACA
20 GGGGGGATATCAAACCTAGAAGAAGGGTACGTCGTAGAGAGACACATGCAGGATGGAG
ACATTGTACTGTTCAACAGACAGCCCTCTCTCCACAAAATGTCGATGATGGGACACAAA
GTGCGTGTGATGTCGGGGAAGACCTTTAGATTAAATTTGAGTGTGACCTCCCCGTACAA
TGCGGATTTTGTGATGGAGACGAGATGAATCTCCACATGCCCCAGAGTTACAACCTCCATAG
CCGAACTGGAGGAGATCTGCATGGTCCCTAAGCAAATCCTTGGACCCCAGAGCAACAA
25 GCCCGTCATGGGGATTGTCCAAGACACACTCACTGGCTTAAGATTCTTCACAATGAGAG
ACGCCTTCTTTGACAGGGGCGAGATGATGCAGATTCTGTACTCCATCGACTTGGACAAG
TACAATGACATCGGACTAGACAC

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:86-91 muestran cebadores usados para amplificar porciones de secuencias de *rpII215* de BSB ejemplares que comprenden *rpII215-1*, *rpII215-2*, y *rpII215-3*, usados
30 en algunos ejemplos para la producción de ARNdh.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:92 muestra un ADN de v2 de *YFP* ejemplar, que se usa en algunos ejemplos para la producción de la hebra sentido de un ARNdh.

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93 y 94 muestran cebadores usados para la amplificación por PCR de v2 de *YFP* de la secuencia de *YFP*, usados en algunos ejemplos para la producción de ARNdh.

- 5 Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95-106 muestran ARN ejemplares transcritos a partir de ácidos nucleicos que comprenden polinucleótidos de *rpII215* ejemplares y sus fragmentos.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107 muestra una secuencia de cóntigos de ADN de 4965 nucleótidos de longitud que comprende *RP11215* de *Meligethes aeneus*.

- 10 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108 muestra una primera secuencia parcial de nucleótidos representativa de un cóntigo de *RP11215* de *M. aeneus*:

ATGGCCGCCAGTGACAGCAAAGCTCCGCTTAGAACCGTTAAAAGAGTGCAGTTTGGTAT
ACTCAGTCCGGATGAAATCCGGCGTATGTCAGTCACAGAGGGCGGCATCCGCTTTCAG
AGACAATGGAGGCGGGCCGCCCAAATTGGGGGGCCTCATGGACCCGAGACAAGGGGT
CATCGACAGACATTCCCGTTGCCAGACGTGCGCGGGTAACATGACAGAATGTCCGGGGTC
15 ATTTTGGCCACATCGAGTTGGCCAAGCCCGTATTTTACGTTGGTTTTGTACGAAAACG
ATCAAAATTTTAAGATGCGTCTGCTTTTTCTGCAGTAAAATGTTAGTTAGTCCAAATAAT
CCAAAATAAAAAGAGGTGGTCATGAAATCCAAAGGTCAGCCGAGGAAAAGGTTGGCTT
TTGTTTACGATCTCTGCAAAGGTAAAAATATTTGCGAGGGTGGGGATGAAATGGATGTA
GGAAA

- 20 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:109 muestra una segunda secuencia parcial de nucleótidos representativa de un cóntigo de *RP11215* de *M. aeneus*:

TCGGCGAGAAATCAGGACGATTTGACTCACAACTGGCCGACATCATCAAAGCGAACA
ACGAGTTGCAAAGGAACGAGGCGGCCGGTACGGCTGCGCACATCATCCTGGAAAACAT
AAAGATGCTGCAGTTTACGTTGGCAACCCTGGTCGACAACGACATGCCGGGGCATGCCA
25 AGAGCCATGCAGAAGTCGGGGAAGCCCCTAAAAGCGATAAAGGCTCGGTTAAAAGGTA
AGGAGGGCAGGATTCGTGGTAACCTTATGGGTAAAGCGTGTGGATTTTTCCGCGCGTACC
GTAATCACGCCCCGATCCCAATCTGCGTATCGATCAGGTCGGGGTTCCGAGGTCCATCGC
GCAGAACATGACGTTCCCTGA

- 30 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:110 muestra una tercera secuencia parcial de nucleótidos representativa de un cóntigo de *RP11215* de *M. aeneus*:

AATGGTGACAGAATAGATTTGAGGTTCCATCCCAAACCGTCAGATTTGCATTTACAGTG
 TGGATACAAAGTAGAAAGACACATTCGTGATGGCGATTTGGTTATTTTCAATCGTCAAC
 CGACCCTCCACAAGATGAGTATGATGGGGCACAGGGTCAAAGTGCTGCCCTGGTCCACT
 TTCAGGATGAATTTGTCCTGTACTTCCCCCTACAACGCCGATTTTCGACGGCGACGAAAT
 5 GAACTTGACAGTTCCGCAAAGTATGGAAACAAGAGCCGAAGTGGAACCTGCACATA
 ACCCCGAGGCAAATTATCACGCCGCAAGCCAATCAACCCGTCATGGGTATCGTGCAAG
 ATACTCTTACCGCGGTGAGAAAGATGACGAAAAGGGACGTTTTTCATCGAGAAGGAACA
 GATGATGAACATACTCATGTTCTTGCCGATTTGGGACGGTAAAATGCCCAGACCGGCCA
 TCCTGAAACCCAAACCCCTCTGGACGGGAAAGCAAATATTCTCGCTGATTATCCCGGGA
 10 AATGTAAATATGATCCGTACGCACTCGACGCATCCCGACGACGAGGACGACGGTCCGT
 ACCGGTGGATCTCCCCCGGCGACACCAAGGTCATGGTGGAGCACGGCGAGTTGATCAT
 GGGGATCCTCTGCAAAAAATCCCTCGGTACTTCCCCCGGTTCTCTCCTCCACATCTGCAT
 GTTGGAGCTGGGGCACGAGGTGTGCGGCAGGTTCTACGGTAACATCCAGACCGTGATC
 AACAATTGGCTGCTCCTCGAAGGTCACAGCATCGGTATCGGAGACACGATCGCCGATCC
 15 TCAGACCTACTTGGAGATCCAAAAGGCCATCCACAAAGCCAAAGAGGATGTCATAGAG
 GTCATCCAGAAGGCTCACAACATGGAGCTGGAACCCAC

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:111 muestra una cuarta secuencia parcial de nucleótidos representativa de un cóntigo de *RPII215* de *M. aeneus*:

GGGGTTAGAGACCTCCTTAAAAAGTGCATCATCGTGGCGGGGGAAGACAGACTCTCCA
 20 AACAAGCCAACGAAAACGCCACCCTACTCTTCCAATGCTTGGTGAGATCCACCCTATGC
 ACAAAGTGCGTTTCGGAGGAGTTCAGGCTGAGCACCGAAGCCTTCGAATGGTTGATCGG
 AGAAATCGAGACGAGATTCCAGCAGGCTCAGGCGAATCCCGGCGAGATGGTGGGCGCG
 TTGGCCGCGCAGTCCCTTGGAGAACCCGCCACTCAGATGACACTCAACACTTTCATTTT
 GCTGGAGTGTCTCCAAAAACGTAACCCTCGGTGTGCCGCGTCTAAAGGAAATCATCAA
 25 CATCTCCAAGAAGCCTAAAGCGCCTTCCCTTACCGTCTTCTTAACCGGGGCTGCAGCCA
 GGGATGCGGAAAAGGCCAAAAACGTGCTCTGTCGCTTGGAACATACCACGTTGAGAAA
 AGTAACGGCAAACACCGCCATTTACTACGATCCCGACCCACAGAATACCGTTATTCCGG
 AGGATCAGGAATTCGTTAATGTTTACTATGAAATGCCCGATTTTCGATCCGACCAGGATC
 TCGCCATGGCTACTTCGTATTGAATTGGATAGAAAACGTATGACGGACAAAAAATTGAC
 30 TATGGAACAGATCGCGGAAAAAATCAACGCCGGCTTCGGTGACGATTTGAATTGTATAT
 TTAATGACGACAACGCCGAGAACTGGTGCTGCGGATTCGTATCATGGACAGCGACGA

CGGTAAATTCGGCGAAGGGGCCGACGAAGACGTGGATAAAATGGACGACGACATGTTT
 TTACGGTGTATCGAGGCCAACATGCTGAGCGACATGACTTTACAGGGTATCGAAGCCAT
 TTCCAAAGTGTACATGCATTTGCCGCAGACAGACTCCAAGAAAAGGATCGTTATAACTG
 ACGCGGGCGAGTTTAAAGCCATTGCGGAATGGCTACTGGAAACTGACGGTACCAGTAT
 5 GATGAAGGTTCTATCTGAAAGAGACGTGGATCCCGTAAGAACGTTCTCCAACGATATCT
 GCGAGATTTTCTCCGTACTCGGCATCGAGGCCGTACGTAAATCGGTGGAGAAAGAAATG
 AACGCCGTGTTGTCGTTCTACGGTCTCTACGTAAACTACCGTCACTTGGCTTTGCTTTGC
 GACGTGATGACGGCCAAAGGTCATCTCATGGCCATCACGCGTCACGGTATCAACAGAC
 AGGACACCGGTGCTCTCATGAGATGCTCGTTCTGAAGAAACGGTGGACGTGCTGCTCGAC
 10 GCCGCCTCGCACGCCGAAGTCGACCCCATGAGAGGCGTGTCCGAGAACATCATCATGG
 GTCAGTTACCTCGTATGGGTACCGGGTGCTTCGACTTGCTCCTGGACGCAGAAAAGTGT
 AAGATGGGTATAGCCATCCCCAAGCTCATGGAGCCGACATAATGTCATCGGGCATGTT
 CTTCGGCTCGGCGGCCACTCCGAGCAGCATGAGCCCCGGAGGAGCCATGACTCCGTGG
 AACCAAGCCGCCACTCCGTACATGGGAAACGCCTGGTCTCCGCACAATCTCATGGGAAG
 15 CGGTATGACCCCCGGAGGACCCGCCTTTTCACCATCCGCAGCCTCCGATGCTTCTGGAA
 TGTCGCCTGGCTATGGAGCGTGGTCTCCTACGCCAAACTCGCCCGCAATGTCTCCTTACA
 TGAGTTCTCCTCGCGGGCAAAGTCCATCATAACAGTCCCTCGAGCCCCCTCATTTCCAACCA
 ACCTCCCCCTCTATCACTCCCACTTCCCCTGGATACTCGCCCAGCTCCCCAGGTTACTCA
 CCAACGAGCCCCAATTACAGCCCAACCTCACCAAGCTATTCTCCAACAAGTCCGAGTTA
 20 TTCGCCTACGTGCGCCA

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:112 muestra una secuencia de 1643 aminoácidos de longitud de una proteína RPII215 de *Meligethes aeneus*.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:113 muestra una primera secuencia de aminoácidos parcial representativa de una proteína RPII215 de *M. aeneus*:

25 MAASDSKAPLRTVKRVQFGILSPDEIRMSVTEGGIRFPETMEAGRPKLGGLMDPRQGVIDR
 HSRCQTCAGNMTECPGHFGHIELAKPVFHVGFVTKTIKILRCVCFECSKMLVSPNNPKIKEV
 VMKSKGQPRKRLAFVYDLCKGKNICEGGDEMDVG

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:114 muestra una segunda secuencia de aminoácidos parcial representativa de una proteína RPII215 de *M. aeneus*:

SARNQDDLTHKLADIKANNELOQRNEAAGTAAHIILENIKMLQFHVATLVDNDMPGMPRA
MQKSGKPLKAIKARLKGKEGRIRGNLMGKRVDFSARTVITPDPNLRIDQVGVP RSIAQNMTF
P

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:115 muestra una tercera secuencia de aminoácidos parcial
5 representativa de una proteína RPII215 de *M. aeneus*:

NGDRIDLRFHHPKPSDLHLQCGYKVERHIRDGD LVIFNRQPTLHKMSMMGHRVKVLPWSTFR
MNLSTSPYNADFDGDEMNLHVPQSMETRAEVENLHITPRQIITPQANQPVMGIVQDTLTA
VRKMTKRDFVIEKEQMMNILMFLPIWDGKMPPAILKPKPLWTGKQIFSLIIPGNVNMIRTH
STHPDDEDDGPYRWISPGDTKVMVEHGELIMGILCKKSLGTSPGSLLHICMLELGHEVCGRF
10 YGNIQTVINNWLLLEGHSIGIGDTIADPQTYLEIQKAIHKAKEDVIEVIQKAHNMELEP

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:116 muestra una cuarta secuencia de aminoácidos parcial
representativa de una proteína RPII215 de *M. aeneus*:

GVRDLLKKCIIVAGEDRLSKQANENATLLFQCLVRSTLCTKCVSEEFRLSTEA FEWLIGE IET
RFQQAQANPGEMVGALAAQSLGEPATQMTLNTFHFAGVSSKNVTLGVPRLKEIINISKKPK
15 APSLTVFLTGA AARDAEKAKNVLCRLEHTTLRKVTANTAIYYDPDPQNTVIPEDQEFVNVY
YEMPDPDPTRISPWLLRIELDRKRMTDKKLTMEQIAEKINAGFGDDLNCIFNDDNAEKLVL R
IRIMDSDDGKFGEGADEDVDKMDDDMFLRCIEANMLS DMTLQGIEAISKVYMHLPQTDSK
KRIVITDAGEFKAIAEWLLET DGTSM MKVLSERDVPVRTFSNDICEIFSVLGIEAVRKSVEK
EMNAVLSFYGLYVNYRHLALLCDVMTAKGHLMAITRHGINRQDTGALMRC SFEETVDVLL
20 DAASHAEVDPMRGVSENIIMGQLPRMGTGCFDLLLLDAEKCKMGIAIPQAHGADIMSSGMFF
GSAATPSSMSPGGAMTPWNQAATPYMGNAWSPHNLMGSGMTPGGPAFSPSAASDASGMS
PGYGAWSPTPNSPAMSPYMSSPRGQSPSYSPSSPSFQPTSPSITPTSPGYSPSSPGYSPTSPNYS
PTSPSYSPTPSYSPSP

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:117 muestra la regl de *RPII215* de *M. aeneus* usada para la
25 producción de ARNdh.

ATGACGACAACGCCGAGAACTGGTGCTGCGGATTCGTATCATGGACAGCGACGACGG
TAAATTCGGCGAAGGGGCCGACGAAGACGTGGATAAAATGGACGACGACATGTTTTTA
CGGTGTATCGAGGCCAACATGCTGAGCGACATGACTTTACAGGGTATCGAAGCCATTTC
CAAAGTGTACATGCATTTGCCGCAGACAGACTCCAAGAAAAGGATCGTTATAACTGAC
30 GCGGGCGAGTTTAAAGCCATTGCGGAATGGCTACTGGAAACTGACGGTACCAGTATGA

TGAAGGTTCTATCTGAAAGAGACGTGGATCCCGTAAGAACGTTCTCCAACGATATCTGC
GAGATTTTCTCCGTACTCGGCATCGA

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:118-123 muestran ARN ejemplares transcritos a partir de ácidos nucleicos que comprenden polinucleótidos de *rpII215* ejemplares y sus fragmentos.

- 5 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:124 muestra un ADN ejemplar que codifica un ARN de v1 de *rpII215* de *Diabrotica*; que contiene un polinucleótido sentido, una secuencia de bucle (cursiva) y un polinucleótido antisentido (fuente subrayada):

GACCCAATGAGAGGAGTATCTGAAAACATTATCCTCGGTCAACTACCAAGAATGGGCA
CAGGCTGCTTCGATCTTTTGCTGGACGCCGAAAAATGTAAAATGGGAATTGCCATACCT
10 *CGAAGCTAGTACCAGTCATCACGCTGGAGCGCACATATAGGCCCTCCATCAGAAAGTCATTGT*
GTATATCTCTCATAGGGAACGAGCTGCTTGCGTATTTCCCTTCCGTAGTCAGAGTCATCAATCA
GCTGCACCGTGTCGTAAAGCGGGACGTTTCGCAAGCTCGTCCGCGGTAGAGGTATGGCAATT
CCCATTTTACATTTTTCGGCGTCCAGCAAAAGATCGAAGCAGCCTGTGCCCATTCTTGGT
AGTTGACCGAGGATAATGTTTTTCAGATACTCCTCTCATTGGGTC

- 15 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:125 muestra una sonda usada para el análisis de la expresión del ARNdh.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:126 muestra una secuencia de nucleótidos de ADN ejemplar que codifica un bucle intermedio en un ARNdh.

- La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:127 muestra un ARNdh transcrito a partir de un ácido nucleico que
20 comprende fragmentos de polinucleótidos de v1 de *rpII215* ejemplares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Descripción general de varias modalidades

- Desarrollamos una interferencia por ARN (iARN) como herramienta para el control de plagas de
25 insectos, con el uso de una de las especies de plagas objetivo más probables para plantas transgénicas que expresan ARNdh; el gusano de la raíz del maíz occidental. Hasta el momento, la mayoría de los genes propuestos como objetivos para la iARN en larvas de gusano de la raíz no logran su objetivo verdaderamente. En la presente, describimos la supresión mediada por la iARN de la *subunidad de 215kD de la ARN polimerasa II (rpII215)* en las plagas de insectos ejemplares, gusano de la raíz del
30 maíz occidental, escarabajo del polen, y chinche café neotropical, que ha demostrado tener un fenotipo letal cuando, por ejemplo, se administran moléculas de ARNi mediante ARNdh de *rpII215*

ingerido o inyectado. En las modalidades de la presente, la capacidad para administrar ARNd_h de *rpII215* mediante la alimentación de los insectos confiere un efecto de iARN que es muy útil para el control de las plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y hemípteros). Mediante la combinación de la iARN mediada por *rpII215* con otros objetivos de iARN útiles (por ejemplo, objetivos de iARN de *ARN polimerasa II*, de acuerdo con lo descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/133214; objetivos de iARN de *ARN polimerasa II33*, de acuerdo con lo descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/133210; objetivos de iARN de *ncm*, de acuerdo con lo descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/095487; objetivos de iARN de ROP, de acuerdo con lo descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 14/577,811; objetivos de iARN de *RNAPIII40*, de acuerdo con lo descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 14/577,854; objetivos de iARN de *Dre4*, de acuerdo con lo descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 14/705,807; objetivos de iARN de *COPI*, de acuerdo con lo descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/063,199; objetivos de iARN de *COPI beta*, de acuerdo con lo descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/063,203; objetivos de iARN *COPI gamma*, de acuerdo con lo descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/063,192; y objetivos de iARN *COPI delta*, de acuerdo con lo descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/063,216), el potencial de afectar múltiples secuencias objetivo, por ejemplo, en gusanos de la raíz larvarios, puede aumentar las oportunidades de desarrollar abordajes sustentables para el control de las plagas de insectos que comprende tecnologías de iARN.

Se describen en la presente métodos y composiciones para el control genético de infestaciones de plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Se proporcionan también métodos para identificar uno o más genes esenciales para el ciclo de vida de una plaga de insectos para usar como gen objetivo para el control mediado por la iARN de una población de plaga de insectos. Los vectores de plásmidos de ADN que codifican una molécula de ARN pueden diseñarse para suprimir uno o más genes objetivo esenciales para el crecimiento, la supervivencia y/o el desarrollo. En algunas modalidades, la molécula de ARN puede ser capaz de formar moléculas de ARNd_h. En algunas modalidades, se proporcionan métodos para la represión postranscripcional de la expresión o la inhibición de un gen objetivo mediante moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una secuencia codificante o no codificante del gen objetivo en una plaga de insectos. En estas y otras modalidades, una plaga puede ingerir una o más moléculas de ARNd_h, ARN_{ip}, ARN_{hp}, miARN, y/o ARN_{horq} transcritas a partir de la totalidad o una porción de una molécula de ácido nucleico que es

complementaria a una secuencia codificante o no codificante de un gen objetivo, mediante lo cual se proporciona un efecto protector vegetal.

De este modo, algunas modalidades comprenden la inhibición específica de secuencia de la expresión de productos génicos objetivo, con el uso de ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN y/o ARNhorq que es

5 complementario a secuencias codificantes y/o no codificantes del gen o genes objetivo para lograr un control al menos parcial de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Se describe un conjunto de moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas que comprenden un polinucleótido, por ejemplo, como se establece en una de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 77, 79, 81 y 107, y sus fragmentos. En algunas modalidades, puede expresarse una molécula de
10 ARNdh estabilizada a partir de estos polinucleótidos, sus fragmentos, o un gen que comprende uno de estos polinucleótidos (por ejemplo, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 124), para el silenciamiento o la inhibición postranscripcional de un gen objetivo. En ciertas modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 107-111 y 117.

15 Algunas modalidades comprenden una célula huésped recombinante (por ejemplo, una célula vegetal) que tiene en su genoma al menos un ADN recombinante que codifica al menos una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh). En modalidades particulares, puede proporcionarse una o más moléculas de ARNdh codificadas cuando se ingieren por una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) para silenciar o inhibir postranscripcionalmente la expresión de un gen
20 objetivo en la plaga. El ADN recombinante puede comprender, por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 107-111, y 117, fragmentos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 107-111, y 117, y un polinucleótido que consiste en una secuencia parcial de un gen que comprende una de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 107-111, y 117y/o sus complementos.

25 Algunas modalidades comprenden una célula huésped recombinante que tiene en su genoma un ADN recombinante que codifica al menos una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:96, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:97, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:102, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:118,
30 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:119, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:120, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:121, y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:122, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:123 (por ejemplo,

al menos un polinucleótido seleccionado de un grupo que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:98-100, 104-106, y 119-123), o sus complementos. Cuando se ingiere por una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), la molécula de ARNi puede silenciar o inhibir la expresión de un ADN de *rpII215* objetivo (por ejemplo, un ADN que comprende la totalidad o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 107-111 y 117) en la plaga o en la progenie de la plaga, lo que resulta de ese modo en el cese del crecimiento, desarrollo, viabilidad y/o alimentación de la plaga.

En algunas modalidades, una célula huésped recombinante que tiene en su genoma al menos un ADN recombinante que codifica al menos una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNdh puede ser una célula vegetal transformada. Algunas modalidades comprenden plantas transgénicas que comprenden una célula vegetal transformada de este tipo. Además de tales plantas transgénicas, se proporcionan todas las plantas de progenie de cualquier generación de plantas transgénicas, semillas transgénicas y productos de plantas transgénicas, cada uno de los cuales comprende ADN recombinante(s). En modalidades particulares, una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNdh puede expresarse en una célula vegetal transgénica. Por lo tanto, en estas y otras modalidades, una molécula de ARNdh puede aislarse de una célula vegetal transgénica. En modalidades particulares, la planta transgénica es una planta seleccionada del grupo que comprende maíz (*Zea mays*), soja (*Glycine max*), algodón (*Gossypium* sp.), canola (*Brassica* sp.) y plantas de la familia *Poaceae*.

Algunas modalidades comprenden un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de plaga de insecto (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). En estas y otras modalidades, puede proporcionarse 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 ARNdh. En modalidades particulares, un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNdh puede unirse operativamente a un promotor y también puede unirse operativamente a una secuencia de terminación de la transcripción. En modalidades particulares, un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de plaga de insecto puede comprender: (a) transformar una célula vegetal con un vector que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNdh; (b) cultivar la célula vegetal transformada en condiciones suficientes como para permitir el desarrollo de un cultivo de células vegetales que comprende una pluralidad de células vegetales transformadas; (c) seleccionar una célula

vegetal transformada que ha integrado el vector a su genoma; y (d) determinar que la célula vegetal transformada seleccionada comprende la molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNdh codificada por el polinucleótido del vector. Una planta puede regenerarse a partir de una célula vegetal que tiene el vector integrado en su genoma y comprende la molécula de ARNdh codificada por el polinucleótido del vector.

De este modo, se describe también una planta transgénica que comprende un vector que tiene un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNdh integrada en su genoma, en donde la planta transgénica comprende la molécula de ARNdh codificada por el polinucleótido del vector. En modalidades particulares, la expresión de una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNdh en la planta es suficiente para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros o hemípteros) que se pone en contacto con la planta transformada o la célula vegetal transformada (por ejemplo, al alimentarse de la planta transformada, una parte de la planta (por ejemplo, la raíz) o célula vegetal), de manera que el crecimiento y/o la supervivencia de la plaga se inhibe. Las plantas transgénicas descritas en la presente pueden presentar protección y/o protección mejorada contra las infestaciones de plagas de insectos. Las plantas transgénicas particulares pueden presentar protección y/o protección mejorada contra una o más plagas de coleópteros y/o hemípteros seleccionadas del grupo que consiste en: WCR; BSB; NCR; SCR; MCR; *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; *D. speciosa* Germar; *Meligethes aeneus* Fabricius; *Euschistus heros* (Fabr.); *E. servus* (Say); *Nezara viridula* (L.); *Piezodorus guildinii* (Westwood); *Halyomorpha halys* (Stål); *Chinavia hilare* (Say); *C. marginatum* (Palisot de Beauvois); *Dichelops melacanthus* (Dallas); *D. furcatus* (F.); *Edessa mediatubunda* (F.); *Thyanta perditor* (F.); *Horcias nobilellus* (Berg); *Taedia stigmosa* (Berg); *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Méneville); *Neomegalotomus parvus* (Westwood); *Leptoglossus zonatus* (Dallas); *Niesthrea sidae* (F.); *Lygus hesperus* (Knight); y *L. lineolaris* (Palisot de Beauvois).

Se describen también en la presente métodos para administrar agentes de control, como, por ejemplo, una molécula de ARNi, a una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Estos agentes de control pueden causar, directa o indirectamente, un perjuicio en la capacidad de una población de plaga de insectos de alimentarse, crecer o de otro modo causar daño en un huésped. En algunas modalidades, se proporciona un método que comprende la administración de una molécula de ARNdh estabilizada a una plaga de insectos para suprimir al menos un gen objetivo en la plaga, para causar de ese modo la iARN y reducir o eliminar el daño a la planta en un huésped de la plaga. En

algunas modalidades, un método para inhibir la expresión de un gen objetivo en la plaga de insectos puede resultar en el cese del crecimiento, la supervivencia y/o el desarrollo en la plaga.

En algunas modalidades, se proporcionan composiciones (por ejemplo, una composición tópica) que comprenden una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh) para usar en plantas, animales y/o el ambiente de una planta o un animal a los efectos de lograr la eliminación o reducción de la infestación de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). En modalidades particulares, la composición puede ser una composición nutritiva o una fuente alimenticia para que la plaga de insectos se alimente de ella, o un cebo de iARN. Algunas modalidades comprenden poner a disposición de la plaga la composición nutritiva o fuente alimenticia. La ingestión de una composición que comprende moléculas de ARNi puede resultar en la captación de las moléculas por una o más células de la plaga, lo cual a su vez puede resultar en la inhibición de la expresión de al menos un gen objetivo en una o más células de la plaga. La ingestión de una planta o célula vegetal o el daño producido en una planta o célula vegetal por parte de una infestación de plaga de insectos puede limitarse o eliminarse en o sobre cualquier tejido huésped o ambiente en el que se halle la plaga mediante la provisión de una o más composiciones que comprenden una molécula de ARNi en el huésped de la plaga.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente pueden usarse juntos en combinaciones con otros métodos y composiciones para controlar el daño que causan las plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Por ejemplo, una molécula de ARNi de acuerdo con lo descrito en la presente para proteger a las plantas contra las plagas de insectos puede usarse en un método que comprende el uso adicional de uno o más agentes químicos efectivos contra una plaga de insectos, bioplaguicidas efectivos contra esa plaga, rotación de cultivos, técnicas genéticas recombinantes que presentan características diferentes de las características de los métodos mediados por la iARN y composiciones de iARN (por ejemplo, producción recombinante de proteínas en plantas que son dañinas para una plaga de insectos (por ejemplo, toxinas *Bt* y polipéptidos PIP-1 (Véase la publicación de patente de los Estados Unidos núm. US 2014/0007292 A1)), y/o expresión recombinante de otras moléculas de ARNi.

II. Abreviaturas

BSB chinche café neotropical (*Euschistus heros*)

ARNdh ácido ribonucleico de doble hebra

IC inhibición del crecimiento

	NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información de Biotecnología)
	ADNg	ácido desoxirribonucleico genómico
	ARNi	ácido ribonucleico inhibidor
5	ORF	Marco abierto de lectura
	iARN	interferencia por ácido ribonucleico
	miARN	ácido microrribonucleico
	ARNhp	ácido ribonucleico de horquilla pequeño
	ARNip	ácido ribonucleico inhibidor pequeño
10	ARNhorq	ácido ribonucleico de horquilla
	UTR	Región no traducida
	WCR	Gusano de la raíz del maíz occidental (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> LeConte)
	NCR	Gusano de la raíz del maíz del norte (<i>Diabrotica barberi</i> Smith y Lawrence)
	MCR	Gusano de la raíz del maíz mexicano (<i>Diabrotica virgifera zea</i> Krysan y Smith)
15	PB	Escarabajo del polen (<i>Meligethes aeneus</i> Fabricius)
	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
	qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
	RISC	Complejo silenciador inducido por ARN
	SCR	Gusano de la raíz del maíz del sur (<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> Barber)
20	EEM	Error estándar de la media

III. Términos

En la descripción y las tablas a continuación, se usan varios términos. A los efectos de proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluso del alcance que debe darse a esos términos, se proporcionan las siguientes definiciones:

- 25 Plaga de coleópteros: De acuerdo con su uso en la presente, el término “plaga de coleópteros” se refiere a insectos plaga del orden Coleóptera, que incluyen insectos plaga del género *Diabrotica*, que se alimentan de cultivos agrícolas y productos de cultivo, que incluyen maíz y otros pastos verdaderos. En los ejemplos particulares, se selecciona una plaga de coleópteros de un listado que comprende *D. v. virgifera* LeConte (WCR); *D. barberi* Smith y Lawrence (NCR); *D. u. howardi* (SCR); *D. v. zea* (MCR); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; *D.*
- 30 *speciosa* Germar; y *Meligethes aeneus* Fabricius.

Contacto (con un organismo): De acuerdo con su uso en la presente, el término "contacto con" o "captación por parte de" un organismo (por ejemplo, una plaga de coleópteros o hemípteros), con respecto a una molécula de ácido nucleico, incluye la internalización de la molécula de ácido nucleico en el organismo, por ejemplo, en forma no taxativa: ingestión de la molécula por el organismo (por ejemplo, mediante alimentación); contacto del organismo con una composición que comprende la molécula de ácido nucleico; y empapado de los organismos con una solución que comprende la molécula de ácido nucleico.

Cóntigo: De acuerdo con su uso en la presente, el término "cóntigo" se refiere a una secuencia de ADN que se reconstruye a partir de un conjunto de segmentos de ADN superpuestos derivados de una única fuente genética.

Planta de maíz: De acuerdo con su uso en la presente, el término "planta de maíz" se refiere a una planta de la especie, *Zea mays* (maíz).

Expresión: De acuerdo con su uso en la presente, "expresión" de un polinucleótido codificante (por ejemplo, un gen o un transgen) se refiere al proceso mediante el cual la información codificada de una unidad transcripcional de ácido nucleico (que incluye, por ejemplo, ADNg o ADNc) se convierte en una parte operativa, no operativa o estructural de una célula, que con frecuencia incluye la síntesis de una proteína. La expresión génica puede ser influenciada por señales externas; por ejemplo, la exposición de una célula, un tejido u organismo a un agente que aumenta o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen también puede regularse en cualquier lugar de la ruta de ADN a ARN a proteína. La regulación de la expresión génica se produce, por ejemplo, a través de controles que actúan en la transcripción, traducción, transporte y procesamiento del ARN, la degradación de moléculas intermediarias como, por ejemplo, ARNm, o a través de la activación, inactivación, compartimentación, o degradación de moléculas de proteínas específicas luego de producirlas, o mediante sus combinaciones. La expresión génica puede medirse a nivel del ARN o a nivel de la proteína mediante cualquier método conocido en la técnica que incluye, por ejemplo, transferencia northern, RT-PCR, transferencia western, o ensayo(s) de la actividad de la proteína *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*.

Material genético: De acuerdo con su uso en la presente, el término "material genético" incluye todos los genes, y moléculas de ácido nucleico como, por ejemplo, ADN o ARN.

Plaga de hemípteros: De acuerdo con su uso en la presente, el término "plaga de hemípteros" se refiere a insectos plaga del orden Hemiptera, que incluyen, por ejemplo, en forma no taxativa, insectos

de las familias Pentatomidae, Miridae, Pyrrhocoridae, Coreidae, Alydidae, y Rhopalidae, que se alimentan de un amplio rango de plantas huéspedes y tienen partes bucales succionadoras o perforadoras. En los ejemplos particulares, una plaga de hemípteros se selecciona del listado que comprende *Euschistus heros* (Fabr.) (chinche café neotropical), *Nezara viridula* (L.) (chinche verde del sur), *Piezodorus guildinii* (Westwood) (chinche de la alfalfa), *Halyomorpha halys* (Stål) (chinche café marmolada), *Chinavia hilare* (Say) (chinche verde), *Euschistus servus* (Say) (chinche café), *Dichelops melacanthus* (Dallas), *Dichelops furcatus* (F.), *Edessa meditabunda* (F.), *Thyanta perditor* (F.) (chinche de hombros rojos neotropical), *Chinavia marginatum* (Palisot de Beauvois), *Horcias nobilellus* (Berg) (chinche del algodón), *Taedia stigmata* (Berg), *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Méneville), *Neomegalotomus parvus* (Westwood), *Leptoglossus zonatus* (Dallas), *Niesthrea sidae* (F.), *Lygus hesperus* (Knight) (chinche opaca de las plantas occidental), y *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois).

Inhibición: De acuerdo con su uso en la presente, el término "inhibición", cuando se usa para describir un efecto sobre un polinucleótido codificante (por ejemplo, un gen), se refiere a una disminución mensurable en el nivel celular del ARNm transcrito a partir del polinucleótido codificante y/o el producto de péptido, polipéptido, o proteína del polinucleótido codificante. En algunos ejemplos, la expresión de un polinucleótido codificante puede inhibirse de manera que la expresión se elimine aproximadamente. "Inhibición específica" se refiere a la inhibición de un polinucleótido codificante objetivo sin afectar por consiguiente la expresión de otros polinucleótidos codificantes (por ejemplo, genes) en la célula en donde se realiza la inhibición específica.

Insecto: De acuerdo con su uso en la presente con respecto a las plagas, el término "plaga de insectos" incluye específicamente plagas de insectos coleópteros. En algunos ejemplos, el término "plaga de insectos" se refiere específicamente a una plaga de coleópteros del género *Diabrotica* seleccionado de un listado que comprende *D. v. virgifera* LeConte (WCR); *D. barberi* Smith y Lawrence (NCR); *D. u. howardi* (SCR); *D. v. zea* (MCR); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; y *D. speciosa* Germar. En algunas modalidades, el término también incluye algunas otras plagas de insectos, por ejemplo, plagas de insectos hemípteros.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (como, por ejemplo, un ácido nucleico o una proteína) se ha separado sustancialmente, producido aparte, o purificado lejos de otros componentes biológicos de la célula del organismo en el que se produce naturalmente el componente (es decir, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, y proteínas), mientras se efectúa un cambio químico o funcional

en el componente (por ejemplo, un ácido nucleico puede aislarse de un cromosoma mediante la ruptura de enlaces químicos que conectan el ácido nucleico con el ADN restante en el cromosoma). Las moléculas de ácido nucleico y las proteínas que se "aislaron" incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas mediante métodos de purificación estándar. El término también abarca a los ácidos nucleicos y las proteínas que se prepararon mediante expresión recombinante en una célula huésped, así como también las moléculas de ácido nucleico, proteínas, y péptidos sintetizados químicamente.

Molécula de ácido nucleico: De acuerdo con su uso en la presente, el término "molécula de ácido nucleico" puede referirse a una forma polimérica de nucleótidos, que puede incluir hebras sentido y antisentido de ARN, ADNc, ADNg, y las formas sintéticas y polímeros mixtos de los mencionados anteriormente. Un nucleótido o una nucleobase puede referirse a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido, o a una forma modificada de cualquiera de esos tipos de nucleótidos. Una "molécula de ácido nucleico", de acuerdo con su uso en la presente, es sinónimo de "ácido nucleico" y "polinucleótido". Una molécula de ácido nucleico generalmente tiene al menos 10 bases de longitud, a menos que se especifique de otro modo. Por convención, la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico se lee desde el extremo 5' al 3' de la molécula. El "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 comprenden un ADN plantilla que se transcribe a una molécula de ARN que es el complemento de una molécula de ARNm. En estas modalidades, el complemento del ácido nucleico transcrito a la molécula de ARNm se halla presente en la orientación de 5' a 3', de manera que la ARN polimerasa (que transcribe el ADN en la dirección 5' a 3') transcribirá un ácido nucleico a partir del complemento que puede hibridarse a la molécula de ARNm. A menos que se mencione explícitamente de otro modo, o resulte claro de otro modo a partir del contexto, el término "complemento" se refiere por lo tanto a un polinucleótido que tiene nucleobases, de 5' a 3', que pueden formar pares de bases con las nucleobases de un ácido nucleico de referencia. De manera similar, a menos que se mencione explícitamente de otro modo (o resulte claro de otro modo a partir del contexto), el "complemento inverso" de un ácido nucleico se refiere al complemento en orientación inversa. Lo expuesto anteriormente se demuestra en la siguiente ilustración:

ATGATGATG polinucleótido

TACTACTAC "complemento" del polinucleótido

CATCATCAT“complemento inverso” del polinucleótido

Algunas modalidades de la invención pueden incluir moléculas de ARNi formadoras de ARN de horquilla. En estas moléculas de ARNi, tanto el complemento de un ácido nucleico que será objetivo de la interferencia por ARN como también el complemento inverso pueden hallarse en la misma molécula, de manera que la molécula de ARN de una hebra puede “plegarse” e hibridarse a sí misma sobre la región que comprende a los polinucleótidos complementarios y complementarios inversos.

Las "moléculas de ácido nucleico" incluyen a todos los polinucleótidos, por ejemplo: formas de una hebra y doble hebra de ADN; formas de una hebra de ARN; y formas de doble hebra de ARN (ARNdh). El término "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a ambas hebras sentido y antisentido de un ácido nucleico ya sea como hebras únicas individuales o en el dúplex. El término "ácido ribonucleico" (ARN) es inclusivo de ARNi (ARN inhibidor), ARNdh (ADN de doble hebra), ARNip (ARN de interferencia pequeño), ARNhp (ARN de horquilla pequeño), ARNm (ARN mensajero), miARN (microARN), ARNhorq (ARN de horquilla), ARNt (ARN de transferencia, ya sean cargados o descargados con un aminoácido acilado correspondiente), y ARNc (ARN complementario). El término "ácido desoxirribonucleico" (ADN) es inclusivo de ADNc, ADNg, e híbridos de ADN-ARN. Los expertos en la técnica entenderán los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico", y sus "fragmentos" como un término que incluye tanto ADNg, ARN ribosomales, ARN de transferencia, ARN mensajeros, operones, y polinucleótidos más pequeños diseñados que codifican o pueden adaptarse para codificar, péptidos, polipéptidos, o proteínas.

Oligonucleótido: Un oligonucleótido es un polímero de ácido nucleico corto. Los oligonucleótidos pueden formarse mediante la escisión de segmentos de ácido nucleico de mayor longitud, o mediante la polimerización de precursores de nucleótidos individuales. Los sintetizadores automatizados permiten la síntesis de oligonucleótidos de hasta varios cientos de bases de longitud. Debido a que los oligonucleótidos pueden unirse a un ácido nucleico complementario, pueden usarse como sondas para detectar ADN o ARN. Los oligonucleótidos compuestos por ADN (oligodesoxirribonucleótidos) pueden usarse en PCR, una técnica para la amplificación de ADN. En la PCR, el oligonucleótido se menciona generalmente como un "cebador", que permite que una ADN polimerasa extienda el oligonucleótido y replique la hebra complementaria.

Una molécula de ácido nucleico puede incluir cualquiera o ambos nucleótidos, producidos naturalmente y modificados, unidos juntos mediante enlaces de nucleótidos producidos naturalmente

y/o no producidos naturalmente. Las moléculas de ácidos nucleicos pueden modificarse de manera química o bioquímica, o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivadas, tal como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos producidos naturalmente con un análogo, modificaciones internucleótidos (por ejemplo, enlaces no cargados: por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforoamidatos, carbamatos, *etc.*; enlaces cargados: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, *etc.*; fracciones pendientes: por ejemplo, péptidos; intercaladores: por ejemplo, acridina, psoralen, *etc.*; quelantes; alquilantes; y enlaces modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos alfaanoméricos, *etc.*). El término "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier conformación topológica, que incluye conformaciones de una hebra, doble hebra, circulares, con forma de candado, horquilla, parcialmente en dúplex, y tríplex.

De acuerdo con su uso en la presente con respecto al ADN, el término "polinucleótido codificante", "polinucleótido estructural" o "molécula de ácido nucleico estructural" se refiere a un polinucleótido que finalmente se traduce a un polipéptido, mediante transcripción y ARNm, cuando se coloca bajo el control de elementos reguladores adecuados. Con respecto a ARN, el término "polinucleótido codificante" se refiere a un polinucleótido que se traduce a un péptido, polipéptido o proteína. Los límites de un polinucleótido codificante se determinan mediante un codón de inicio de la traducción en el terminal 5' y un codón de terminación de la traducción en el terminal 3'. Los polinucleótidos codificantes incluyen, en forma no taxativa: ADNg; ADNc; EST; y polinucleótidos recombinantes.

De acuerdo con su uso en la presente, "polinucleótido no codificante transcrito" se refiere a segmentos de moléculas de ARNm como, por ejemplo, 5'UTR, 3'UTR, y segmentos de intrones que no se traducen a un péptido, polipéptido, o proteína. Además, "polinucleótido no codificante transcrito" se refiere a un ácido nucleico que se transcribe a un ARN que funciona en la célula, por ejemplo, ARN estructurales (por ejemplo, ARN ribosomal (ARNr) como se ejemplifica mediante ARNr 5S, ARNr 5.8S, ARNr 16S, ARNr 18S, ARNr 23S, y ARNr 28S, y similares); ARN de transferencia (ARNt); y ARNpn como, por ejemplo, U4, U5, U6, y similares. Los polinucleótidos no codificantes transcritos también incluyen, por ejemplo, en forma no taxativa, ARN pequeños (ARNp), término que se usa con frecuencia para describir ARN no codificantes bacterianos pequeños; ARN nucleolares pequeños (ARNnop); microARN (miARN); ARN de interferencia pequeños (ARNip); ARN que interactúa con Piwi (ARNpi); y ARN no codificantes largos. Incluso, además, "polinucleótido no codificante

transcrito" se refiere a un polinucleótido que puede existir en forma nativa como un "espaciador" intragénico en un ácido nucleico y que se transcribe a una molécula de ARN.

Interferencia por ARN letal: De acuerdo con su uso en la presente, el término "interferencia por ARN letal" se refiere a la interferencia por ARN que resulta en la muerte o la reducción de la viabilidad del individuo en cuestión al que, por ejemplo, se administra un ARNdh, miARN, ARNip, ARNhp, y/o ARNhorq.

Genoma: De acuerdo con su uso en la presente, el término "genoma" se refiere al ADN cromosómico que se halla dentro del núcleo de una célula, y se refiere también al ADN organelar que se halla dentro de componentes subcelulares de la célula. En algunas modalidades de la invención, se puede introducir una molécula de ADN en una célula vegetal, de manera que la molécula de ADN se integre en el genoma de la célula vegetal. En estas y otras modalidades, la molécula de ADN puede integrarse en el ADN nuclear de la célula vegetal, o bien puede integrarse en el ADN del cloroplasto o de la mitocondria de la célula vegetal. El término "genoma", de acuerdo a su aplicación a bacterias, se refiere tanto al cromosoma como también a los plásmidos dentro de la célula bacteriana. En algunas modalidades de la invención, se puede introducir una molécula de ADN en una bacteria de manera que la molécula de ADN se integre en el genoma de la bacteria. En estas y otras modalidades, la molécula de ADN puede integrarse cromosómicamente o ubicarse como plásmido estable o en un plásmido estable.

Identidad de secuencias: El término "identidad de secuencias" o "identidad", de acuerdo con su uso en la presente en el contexto de dos polinucleótidos o polipéptidos, se refiere a los residuos en las secuencias de las dos moléculas que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación específica.

De acuerdo con su uso en la presente, el término "porcentaje de identidad de secuencias" puede referirse al valor determinado mediante la comparación de dos secuencias alineadas en forma óptima (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico o secuencias de polipéptidos) de una molécula sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante la determinación de la cantidad de posiciones en las que aparece el residuo de aminoácido o nucleótido idéntico en ambas secuencias para proporcionar la cantidad de posiciones coincidentes, dividir la cantidad de posiciones coincidentes por la cantidad

total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicar el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencias. Se dice que una secuencia que es idéntica en cada posición en comparación con una secuencia de referencia es 100 % idéntica a la secuencia de referencia y viceversa.

- 5 Los métodos para alinear secuencias a los efectos de la comparación son muy conocidos en la técnica. Diversos programas y algoritmos de alineamiento se describen, por ejemplo, en: 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. USA* 85:2444; Higgins y Sharp (1988) *Gene* 73:237-44; Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-3; Corpet *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang *et al.* 10 (1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65; Pearson *et al.* (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-31; Tatiana *et al.* (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50. Una consideración detallada de los métodos de alineamiento de secuencias y los cálculos de homología puede hallarse, por ejemplo, en Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

- La herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales (BLAST™; Altschul *et al.* (1990)) del 15 Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) se halla disponible de varias fuentes, que incluyen el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (Bethesda, MD), y en la Internet, para usar en conexión con varios programas de análisis de secuencias. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencias con este programa se halla disponible en la Internet en la sección "help" [*Ayuda*] para BLAST™. Para comparaciones de las secuencias de ácidos nucleicos, la 20 función "Blast 2 sequences" del programa BLAST™ (Blastn) puede emplearse con la matriz predeterminada BLOSUM62 establecida con los parámetros predeterminados. Los ácidos nucleicos con una similitud de secuencias aún mayor con respecto a las secuencias de los polinucleótidos de referencia mostrarán un porcentaje creciente de identidad cuando se evalúan mediante este método.

- Específicamente hibridable/específicamente complementario: De acuerdo con su uso en la presente, 25 los términos "específicamente hibridable" y "específicamente complementario" son términos que indican un grado suficiente de complementariedad de manera que se produzca una unión estable y específica entre la molécula de ácido nucleico y una molécula de ácido nucleico objetivo. La hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico comprende la formación de un alineamiento antiparalelo entre las nucleobases de las dos moléculas de ácido nucleico. Las dos moléculas pueden 30 entonces formar enlaces de hidrógeno con bases correspondientes en la hebra opuesta para formar una molécula dúplex que, si es lo suficientemente estable, es detectable con el uso de métodos muy

conocidos en la técnica. Un polinucleótido no necesita ser 100 % complementario a su ácido nucleico objetivo para ser específicamente hibridable. Sin embargo, la cantidad de complementariedad que debe existir para que la hibridación sea específica es una función de las condiciones de hibridación usadas.

- 5 Las condiciones de hibridación que resultan en grados particulares de rigurosidad variarán según la naturaleza del método de hibridación de elección y la composición y longitud de los ácidos nucleicos hibridantes. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{++}) del tampón de hibridación determinará la rigurosidad de la hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen en la rigurosidad. Los cálculos sobre las
- 10 condiciones de hibridación requeridas para lograr grados particulares de rigurosidad son conocidos por aquellos de conocimiento común en la técnica y se explican, 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 Hames y Higgins (eds.) Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, 1985. Otras instrucciones y guías detalladas respecto a la
- 15 hibridación de ácidos nucleicos pueden hallarse, por ejemplo, en Tijssen, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", en Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2, Elsevier, NY, 1993; y Ausubel *et al.*, Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2, Greene Publishing y Wiley-Interscience, NY, 1995.
- 20 De acuerdo con su uso en la presente, las "condiciones rigurosas" comprenden condiciones en las que la hibridación se producirá solamente si existe menos del 20 % de faltas de coincidencia entre la secuencia de la molécula de hibridación y un polinucleótido homólogo dentro de la molécula de ácido nucleico objetivo. Las "condiciones rigurosas" incluyen otros niveles particulares de rigurosidad. De este modo, de acuerdo con su uso en la presente, las condiciones de "rigurosidad moderada" son
- 25 aquellas en las que las moléculas con más de 20 % de faltas de coincidencia no hibridarán; las condiciones de "alta rigurosidad" son aquellas en las que las secuencias con más de 10 % de faltas de coincidencia no hibridarán; y las condiciones de "rigurosidad muy alta" son aquellas en las que las secuencias con más del 5 % de faltas de coincidencia no hibridarán.

Se proporcionan a continuación condiciones de hibridación representativas, no taxativas.

- 30 Condición de alta rigurosidad (detecta polinucleótidos que comparten al menos 90 % de identidad de secuencias): hibridación en tampón SSC 5X a 65 °C durante 16 horas; lavar dos veces en tampón SSC

2x a temperatura ambiente durante 15 minutos cada lavado; y lavar dos veces en tampón SSC 0.5x a 65 °C durante 20 minutos cada lavado.

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

Condición de control no rigurosa (los polinucleótidos que comparten al menos 50 % de identidad de secuencias hibridarán): Hibridación en tampón SSC 6x a temperatura ambiente a 55 °C durante 16-20 horas; lavar al menos dos veces en tampón SSC 2x-3x a temperatura ambiente a 55 °C durante 20-30 minutos cada lavado.

De acuerdo con su uso en la presente, el término "sustancialmente homólogo" u "homología sustancial", con respecto a un ácido nucleico, se refiere a un polinucleótido que tiene nucleobases contiguas que se hibridan en condiciones rigurosas al ácido nucleico de referencia. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que son sustancialmente homólogos a un ácido nucleico de referencia de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 107-111, y 117 son aquellos ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones rigurosas (por ejemplo, las condiciones de rigurosidad moderada establecidas, *supra*) al ácido nucleico de referencia. Los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener al menos un 80 % de identidad de secuencias. Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener de aproximadamente 80 % a 100 % de identidad de secuencias, como, por ejemplo, 79 %; 80 %; aproximadamente 81 %; aproximadamente 82 %; aproximadamente 83 %; aproximadamente 84 %; 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 97 %; aproximadamente 98 %; aproximadamente 98.5 %; aproximadamente 99 %; aproximadamente 99.5 %; y aproximadamente 100 %. La propiedad de homología sustancial se halla estrechamente relacionada con la hibridación específica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico es específicamente hibridable cuando existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del ácido nucleico a polinucleótidos no objetivo en condiciones en las que se desea la unión específica, por ejemplo, en condiciones de hibridación rigurosas.

De acuerdo con su uso en la presente, el término "ortólogo" se refiere a un gen en dos o más especies que se desarrolló a partir de un ácido nucleico ancestral común y puede retener la misma función en las dos o más especies.

De acuerdo con su uso en la presente, se dice que dos moléculas de ácido nucleico presentan una "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de un polinucleótido que se lee en la dirección 5' a 3' es complementario a cada nucleótido del otro polinucleótido cuando se lee en la dirección 3' a 5'. Un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido de referencia presentará una secuencia idéntica al complemento inverso del polinucleótido de referencia. Estos términos y descripciones se hallan bien definidos en la técnica y se entienden fácilmente por las personas de conocimiento común en la técnica.

Operativamente unido: Un primer polinucleótido se halla operativamente unido con un segundo polinucleótido cuando el primer polinucleótido se halla en una relación funcional con el segundo polinucleótido. Cuando se producen de manera recombinante, los polinucleótidos operativamente unidos son generalmente contiguos, y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, en el mismo marco de lectura (por ejemplo, en un ORF fusionado por traducción). Sin embargo, los ácidos nucleicos no necesitan ser contiguos para hallarse operativamente unidos.

El término "operativamente unido" cuando se usa con referencia a un elemento genético regulador y a un polinucleótido codificante, significa que el elemento regulador afecta la expresión del polinucleótido codificante unido. "Elementos reguladores", o "elementos de control", se refieren a polinucleótidos que influyen en el momento y el nivel/la cantidad de transcripción, el procesamiento o estabilidad del ARN, o la traducción del polinucleótido codificante asociado. Los elementos reguladores pueden incluir promotores; líderes de la traducción; intrones; potenciadores; estructuras de tallo y bucle; polinucleótidos que se unen a represores; polinucleótidos con una secuencia de terminación; polinucleótidos con una secuencia de reconocimiento de poliadenilación; *etc.* Los elementos reguladores particulares pueden ubicarse corriente arriba y/o corriente abajo de un polinucleótido codificante operativamente unido a ellos. También, los elementos reguladores particulares operativamente unidos a un polinucleótido codificante pueden estar ubicados en la hebra complementaria asociada de una molécula de ácido nucleico de doble hebra.

Promotor: De acuerdo con su uso en la presente, el término "promotor" se refiere a una región de ADN que puede hallarse corriente arriba del inicio de la transcripción y que puede participar en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un

promotor puede estar operativamente unido a un polinucleótido codificante para la expresión en una célula, o un promotor puede estar operativamente unido a un polinucleótido que codifica un péptido de señal que puede estar operativamente unido a un polinucleótido codificante para la expresión en una célula. Un "promotor vegetal" puede ser un promotor capaz de iniciar la transcripción en células vegetales. Los ejemplos de promotores bajo el control del desarrollo incluyen promotores que preferentemente inician la transcripción en ciertos tejidos como, por ejemplo, hojas, raíces, semillas, fibras, vasos del xilema, traqueidas, o esclerénquima. Estos promotores se mencionan como "preferidos de tejido". Los promotores que inician la transcripción solamente en ciertos tejidos se mencionan como "específicos de tejido". Un promotor "específico del tipo celular" conduce principalmente la expresión en ciertos tipos celulares en uno o más órganos, por ejemplo, las células vasculares en raíces u hojas. Un promotor "inducible" puede ser un promotor que puede hallarse bajo control del ambiente. Los ejemplos de condiciones ambientales que pueden iniciar la transcripción mediante promotores inducibles incluyen condiciones anaeróbicas y la presencia de luz. Los promotores específicos de tejido, preferidos de tejido, específicos del tipo celular, e inducibles constituyen la clase de promotores "no constitutivos". Un promotor "constitutivo" es un promotor que puede estar activo en la mayoría de las condiciones ambientales o en la mayoría de los tejidos o tipos celulares.

Puede usarse cualquier promotor inducible en algunas modalidades de la invención. Véase 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 promotores inducibles ejemplares incluyen, en forma no taxativa: Promotores del sistema ACEI que responden al cobre; gen *In2* de maíz que responde a protectores herbicidas de bencenosulfonamida; represor Tet de Tn10; y el promotor inducible de un gen de hormona esteroidea, cuya actividad transcripcional puede inducirse mediante una hormona glucocorticosteroide (Schena *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:0421).

Los promotores constitutivos ejemplares incluyen, en forma no taxativa: Promotores de virus de plantas, como, por ejemplo, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV); promotores de genes de actina del arroz; promotores de ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 del maíz; y el promotor de ALS, fragmento *XbaI/NcoI* 5' al gen estructural *ALS3* de *Brassica napus* (o un polinucleótido similar a dicho fragmento *XbaI/NcoI*) (Publicación internacional PCT núm. WO96/30530).

Adicionalmente, puede utilizarse cualquier promotor específico de tejido o preferido de tejido en algunas modalidades de la invención. Las plantas transformadas con una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido codificante operativamente unido a un promotor específico de tejido pueden producir el producto del polinucleótido codificante exclusivamente, o con preferencia, en un tejido específico. Los promotores ejemplares específicos de tejido o preferidos de tejido incluyen, en forma no taxativa: Un promotor preferido de semilla, como, por ejemplo, el del gen de la faseolina; un promotor específico de hojas e inducido por luz como, por ejemplo, el de *cab* o *rubisco*; un promotor específico de anteras como, por ejemplo, el de *LAT52*; un promotor específico de polen, como, por ejemplo, el de *Zm13*; y un promotor preferido de microesporas como, por ejemplo, el de *apg*.

Colza, colza de semillas oleaginosas, semilla de colza o canola se refieren a una planta del género *Brassica*; por ejemplo, *B. napus*.

Planta de soja: De acuerdo con su uso en la presente, el término "planta de soja" se refiere a una planta de la especie *Glycine*; por ejemplo, *G. max*.

Transformación: De acuerdo con su uso en la presente, el término "transformación" o "transducción" se refiere a la transferencia de una o más moléculas de ácido nucleico a una célula. Una célula se "transforma" por una molécula de ácido nucleico transducida en la célula cuando la molécula de ácido nucleico se replica en forma estable en la célula, ya sea mediante la incorporación de la molécula de ácido nucleico en el genoma celular, o mediante replicación episomal. De acuerdo con su uso en la presente, el término "transformación" comprende todas las técnicas mediante las cuales una molécula de ácido nucleico puede introducirse en dicha célula. Los ejemplos incluyen, en forma no taxativa: la transfección con vectores virales; transformación con vectores plasmídicos; electroporación (Fromm *et al.* (1986) *Nature* 319:791-3); lipofección (Felgner *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7); microinyección (Mueller *et al.* (1978) *Cell* 15:579-85); transferencia mediada por *Agrobacterium* (Fraley *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7); captación directa de ADN; y bombardeo de microproyectiles (Klein *et al.* (1987) *Nature* 327:70).

Transgen: Un ácido nucleico exógeno. En algunos ejemplos, un transgen puede ser un ADN que codifica una o ambas hebras de un ARN capaz de formar una molécula de ARN^{dh} que comprende un polinucleótido que es complementario a una molécula de ácido nucleico que se halla en una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En otros ejemplos, un transgen puede ser un polinucleótido antisentido, en donde la expresión del polinucleótido antisentido inhibe la expresión de un ácido nucleico objetivo, por lo cual produce un fenotipo de iARN. En incluso otros ejemplos, un transgen puede ser un gen

(por ejemplo, un gen de tolerancia a herbicidas, un gen que codifica un compuesto útil desde el punto de vista industrial o farmacéutico, o un gen que codifica un rasgo agrícola deseable). En estos y otros ejemplos, un transgen puede contener elementos reguladores operativamente unidos a un polinucleótido codificante del transgen (por ejemplo, un promotor).

- 5 Vector: Una molécula de ácido nucleico que se introduce en una célula, por ejemplo, para producir una célula transformada. Un vector puede incluir elementos genéticos que le permiten replicarse en la célula huésped, como, por ejemplo, un origen de replicación. Los ejemplos de vectores incluyen, en forma no taxativa: un plásmido; cósmido; bacteriófago; o virus que transporta ADN exógeno a una célula. Un vector también puede incluir uno o más genes, que incluyen aquellos que producen
- 10 moléculas antisentido, y/o genes marcadores de selección, y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar, o infectar una célula, lo cual hace que la célula exprese las moléculas de ácido nucleico y/o proteínas codificadas por el vector. Un vector incluye opcionalmente materiales para ayudar a lograr el ingreso de la molécula de ácido nucleico a la célula (por ejemplo, un liposoma, recubrimiento de proteína, *etc.*).
- 15 Rendimiento: Un rendimiento estabilizado de aproximadamente 100 % o mayor respecto al rendimiento de variedades testigo en la misma ubicación de cultivo que crecen al mismo tiempo y en las mismas condiciones. En modalidades particulares, "rendimiento mejorado" o "rendimiento que mejora" significa un cultivar que tiene un rendimiento estabilizado de 105 % o más respecto al rendimiento de las variedades testigo en la misma ubicación de cultivo que contiene densidades
- 20 significativas de plagas de coleópteros y/o hemípteros perjudiciales para el cultivo que crece al mismo tiempo y en las mismas condiciones, que constituyen el objetivo de las composiciones y los métodos de la presente.

A menos que se indique específicamente o se halle implícito, los términos "un", "una" y "el/la" significan "al menos uno/a", de acuerdo con su uso en la presente.

- 25 A menos que se explique de otro modo específicamente, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por aquellos de conocimiento común en la técnica a la que pertenece esta descripción. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular pueden hallarse, por ejemplo, en Lewin's Genes X, Jones & Bartlett Publishers, 2009 (ISBN 10 0763766321); Krebs *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular
- 30 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 las mezclas de solventes se expresan en volumen a menos que se indique de otro modo. Todas las temperaturas se hallan en grados Celsius.

IV. Moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de plaga de insectos

5 A. Descripción general

Se describen en la presente moléculas de ácido nucleico útiles para el control de plagas de insectos. En algunos ejemplos, la plaga de insectos es una plaga de insectos coleópteros (por ejemplo, especies del género *Diabrotica*) o hemípteros (por ejemplo, especies del género *Euschistus*). Las moléculas de ácido nucleico descritas incluyen polinucleótidos objetivo (por ejemplo, genes nativos, y polinucleótidos no codificantes), ARNdh, ARNip, ARNhp, ARNhorq, y miARN. Por ejemplo, se describen en algunas modalidades moléculas de ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y/o ARNhorq que pueden ser específicamente complementarias a la totalidad o parte de uno o más ácidos nucleicos nativos en una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En estas y otras modalidades, los ácidos nucleicos nativos pueden ser uno o más genes objetivo, cuyo producto puede, por ejemplo, en forma no taxativa: participar en un proceso metabólico o en el desarrollo larvario/ninfal. Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente, cuando se introducen en una célula que comprende al menos un ácido nucleico nativo al cual las moléculas de ácido nucleico son específicamente complementarias, pueden iniciar la iARN en la célula, y, por consiguiente, reducir o eliminar la expresión del ácido nucleico nativo. En algunos ejemplos, la reducción o eliminación de la expresión de un gen objetivo mediante una molécula de ácido nucleico específicamente complementaria al mismo resulta en la reducción o cese del crecimiento, el desarrollo y/o la alimentación de la plaga.

En algunas modalidades, puede seleccionarse al menos un gen objetivo en una plaga de insectos, en donde el gen objetivo comprende un polinucleótido de *rplI215*. En algunos ejemplos, se selecciona un gen objetivo en una plaga de coleópteros, en donde el gen objetivo comprende un polinucleótido seleccionado entre las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9 y un polinucleótido que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117 (por ejemplo, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107). En algunos ejemplos, se selecciona un gen objetivo en una plaga de hemípteros, en donde el gen objetivo comprende un polinucleótido seleccionado entre las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, y 83-85.

30 En algunas modalidades, un gen objetivo puede ser una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que puede traducirse inversamente *in silico* a un polipéptido que comprende una

secuencia de aminoácidos contigua que es al menos aproximadamente 85 % idéntica (por ejemplo, al menos 84 %, 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 100 %, o 100 % idéntica) a la secuencia de aminoácidos de un producto de proteína de un polinucleótido de *rpII215*. Un gen objetivo puede ser cualquier polinucleótido de *rpII215* en una plaga de insectos, cuya inhibición postranscripcional tiene un efecto perjudicial en el crecimiento, la supervivencia y/o viabilidad de la plaga, por ejemplo, para proporcionar un beneficio protector a una planta contra la plaga. En los ejemplos particulares, un gen objetivo es una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que puede traducirse inversamente *in silico* a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos aproximadamente 85 % idéntica, aproximadamente 90 % idéntica, aproximadamente 95 % idéntica, aproximadamente 96 % idéntica, aproximadamente 97 % idéntica, aproximadamente 98 % idéntica, aproximadamente 99 % idéntica, aproximadamente 100 % idéntica, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:80; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:82, o un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:113-116 (por ejemplo, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:112).

Se proporcionan de acuerdo con la invención ADN, cuya expresión resulta en una molécula de ARN que comprende un polinucleótido específicamente complementario a la totalidad o parte de una molécula de ARN nativa que es codificada por un polinucleótido codificante en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). En algunas modalidades, luego de la ingestión de la molécula de ARN expresada por una plaga de insectos, puede obtenerse la regulación negativa del polinucleótido codificante en las células de la plaga. En modalidades particulares, puede obtenerse la regulación negativa del polinucleótido codificante en las células de la plaga. En modalidades particulares, la regulación negativa del polinucleótido codificante en las células de la plaga de insectos resulta en un efecto perjudicial en el crecimiento y/o desarrollo de la plaga.

En algunas modalidades, los polinucleótidos objetivo incluyen ARN no codificantes transcritos, como, por ejemplo, 5'UTR; 3'UTR; líderes empalmados; intrones; outrones (por ejemplo, ARN de 5'UTR modificado posteriormente en transempalme); donatriones (por ejemplo, ARN no codificante requerido para proporcionar secuencias donantes para el *transempalme*); y otros ARN no codificantes

transcritos de genes de plagas de insectos objetivo. Estos polinucleótidos pueden derivarse tanto de genes monocistrónicos como también policistrónicos.

De este modo, se describen también en la presente en conexión con algunas modalidades moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNhorq) que comprenden al menos un

5 polinucleótido que es específicamente complementario a la totalidad o parte de un ácido nucleico objetivo en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). En algunas modalidades, una molécula de ARNi puede comprender polinucleótidos que son complementarios a la totalidad o parte de una pluralidad de ácidos nucleicos objetivo; por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más ácidos nucleicos objetivo. En modalidades particulares, una molécula de ARNi puede producirse *in vitro* o *in vivo* por un organismo genéticamente modificado, como, por ejemplo, una planta o una

10 bacteria. Se describen también ADNc que pueden usarse para la producción de moléculas de ARNdh, moléculas de ARNip, moléculas de miARN, moléculas de ARNhp, y/o moléculas de ARNhorq que son específicamente complementarias a la totalidad o parte de un ácido nucleico objetivo en una plaga de insectos. Se describen también constructos de ADN recombinante para usar en el logro de la

15 transformación estable de huéspedes objetivos particulares. Los huéspedes objetivos transformados pueden expresar niveles efectivos de moléculas de ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y/o ARNhorq a partir de constructos de ADN recombinante. Por lo tanto, también se describe un vector de transformación de plantas que comprende al menos un polinucleótido operativamente unido a un promotor heterólogo funcional en una célula vegetal, en donde la expresión del polinucleótido resulta

20 en una molécula de ARN que comprende una cadena de nucleobases contiguas que son específicamente complementarias a la totalidad o parte de un ácido nucleico objetivo en una plaga de insectos.

En los ejemplos particulares, las moléculas de ácido nucleico útiles para el control de una plaga de coleópteros o hemípteros pueden incluir: la totalidad o parte de un ácido nucleico nativo aislado de un

25 organismo *Diabrotica* que comprende un polinucleótido de *rpII215* (por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, y 7-9); la totalidad o parte de un ácido nucleico nativo aislado de un organismo hemíptero que comprende un polinucleótido de *rpII215* (por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, 81, y 83-85); la totalidad o parte de un ácido nucleico nativo aislado de un organismo *Meligethes* que comprende un polinucleótido de *rpII215* (por ejemplo,

30 cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107-111 y 117); ADN que al expresarse resultan en una molécula de ARN que comprende un polinucleótido que es específicamente complementario a la

totalidad o parte de una molécula de ARN nativa que es codificada por *rpII215*; moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, and ARNhorq) que comprenden al menos un polinucleótido que es específicamente complementario a la totalidad o parte de *rpII215*; ADNc que pueden usarse para la producción de moléculas de ARNdh, moléculas de ARNip, moléculas de miARN, moléculas de ARNhp, y/o moléculas de ARNhorq que son específicamente complementarias a la totalidad o parte de *rpII215*; y constructos de ADN recombinante para usar en el logro de la transformación estable de huéspedes objetivos particulares, en donde un huésped objetivo transformado comprende una o más de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente.

B. Moléculas de ácido nucleico

- 10 La presente invención proporciona, *inter alia*, moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNhorq) que inhiben la expresión del gen objetivo en una célula, un tejido, u órgano de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros); y moléculas de ADN capaces de expresarse como una molécula de ARNi en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen objetivo en una célula, un tejido, u órgano de una plaga de insectos.
- 15 Algunas modalidades de la invención proporcionan una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos un polinucleótido (por ejemplo, uno, dos, tres o más) seleccionado del grupo que consiste en: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, o un polinucleótido de 4965 nucleótidos de longitud que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; el complemento de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 3, 5, o de un polinucleótido de 4965 nucleótidos de longitud que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 3, 5, o de un polinucleótido de 4965 nucleótidos de longitud que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117 (por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111, y 117); el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 3, 5, o de un polinucleótido de 4965 nucleótidos de longitud que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9; y el complemento de un fragmento de al menos
- 20
- 25
- 30

15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9, un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117.

Algunas modalidades de la invención proporcionan una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos un polinucleótido (por ejemplo, uno, dos, tres, o más) seleccionado del grupo que consiste en: las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, o 81; el complemento de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, o 81 (por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83, 84, o 85); el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, o 81; un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, o 81; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85.

En modalidades particulares, el contacto con una plaga de insectos o la captación por parte de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) de un ARNi transcrito a partir del polinucleótido aislado inhibe el crecimiento, el desarrollo, y/o la alimentación de la plaga. En algunas modalidades, el contacto con el insecto o la captación por parte del insecto se produce al alimentarse el insecto del material vegetal que comprende el ARNi. En algunas modalidades, el contacto con el insecto o la captación por parte del insecto se produce mediante la atomización de una planta que comprende el insecto con una composición que comprende el ARNi.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención puede comprender al menos un polinucleótido (por ejemplo, uno, dos, tres o más) seleccionado del grupo que consiste en: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:96; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:96; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:97; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:97; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:98; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:98; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:100; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:100; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:118; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:118; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:119; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:119; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:120; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:120; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:121; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:121; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:122; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:122; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:123; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:123; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95-97; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95-97; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95-100; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95-100; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95-100; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95-100; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:119-123; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:119-123; un polinucleótido codificante nativo de 4965 nucleótidos de longitud de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:119-123; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de 4965 nucleótidos de longitud de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:119-123; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de 4965 nucleótidos de longitud de un organismo

Meligethes que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:119-123; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de 4965 nucleótidos de longitud de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:119-123.

- 5 En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención puede comprender al menos un polinucleótido (por ejemplo, uno, dos, tres o más) seleccionado del grupo que consiste en: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:102; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:102; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:105; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:105; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101-103; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101-103; un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104-106; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104-106; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104-106; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104-106.

25 En modalidades particulares, el contacto con una plaga de coleópteros y/o hemípteros o la captación por parte de esa plaga del polinucleótido aislado inhibe el crecimiento, el desarrollo y/o la alimentación de la plaga. En algunas modalidades, el contacto o la captación por parte del insecto se produce mediante la alimentación de un material vegetal o cebo que comprende el ARNi. En algunas modalidades, el contacto con el insecto o la captación por parte del insecto se produce mediante la atomización de una planta que comprende al insecto con una composición que comprende el ARNi.

30 En ciertas modalidades, las moléculas de ARNdh proporcionadas por la invención comprenden polinucleótidos complementarios a un transcrito de un gen objetivo que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 108-111, y 117, y sus fragmentos,

donde la inhibición del gen objetivo en una plaga de insectos resulta en la reducción o eliminación de un agente polipéptido o polinucleótido que es esencial para el crecimiento, el desarrollo, u otra función biológica de la plaga. Un polinucleótido seleccionado puede presentar de aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 % de identidad de secuencias respecto a cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 108-111, y 117; un fragmento contiguo de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 108-111, y 117; y el complemento de cualquiera de los mencionados anteriormente. Por ejemplo, un polinucleótido seleccionado puede presentar 79 %; 80 %; aproximadamente 81 %; aproximadamente 82 %; aproximadamente 83 %; aproximadamente 84 %; 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 97 %; aproximadamente 98 %; aproximadamente 98.5 %; aproximadamente 99 %; aproximadamente 99.5 %; o aproximadamente 100 % de identidad de secuencias respecto a cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 108-111, y 117; un fragmento contiguo de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 108-111, y 117; y el complemento de cualquiera de los mencionados anteriormente. En algunos ejemplos, una molécula de ARNdh se transcribe a partir de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:114.

En algunas modalidades, una molécula de ADN capaz de expresarse como una molécula de ARNi en una célula o en un microorganismo para inhibir la expresión del gen objetivo puede comprender un único polinucleótido que es específicamente complementario a la totalidad o parte de un polinucleótido nativo que se halla en una o más especies de plagas de insectos objetivo (por ejemplo, una especie de plaga de coleópteros o hemípteros), o la molécula de ADN puede construirse como una quimera a partir de una pluralidad de dichos polinucleótidos específicamente complementarios.

En otras modalidades, una molécula de ácido nucleico puede comprender un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido separados por un “espaciador”. Un espaciador puede ser una región que comprende cualquier secuencia de nucleótidos que facilita la formación de la estructura secundaria entre los polinucleótidos primero y segundo, donde se desea. En una modalidad, el espaciador es parte de un polinucleótido codificante sentido o antisentido para ARNm. El espaciador puede comprender alternativamente cualquier combinación de nucleótidos o sus homólogos que son capaces de unirse de manera covalente a una molécula de ácido nucleico.

Por ejemplo, en algunas modalidades, la molécula de ADN puede comprender un polinucleótido que codifica para una o más moléculas de ARNi diferentes, en donde cada una de las diferentes moléculas de ARNi 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 conectarse dentro de una molécula de ARN mediante un espaciador. El espaciador puede formar parte del primer polinucleótido o del segundo polinucleótido. La expresión de una molécula de ARN que comprende los polinucleótidos de nucleótidos primero y segundo puede conducir a la formación de una molécula de ARNdh, mediante apareamiento de bases intramolecular específico de los polinucleótidos de nucleótidos primero y segundo. El primer polinucleótido o el segundo polinucleótido pueden ser sustancialmente idénticos a un polinucleótido (por ejemplo, un gen objetivo, o polinucleótido no codificante transcrito) nativo de una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de coleópteros o hemípteros), un derivado del mismo, o un polinucleótido complementario del mismo.

Las moléculas de ácido nucleico de ARNdh comprenden hebras dobles de ribonucleótidos polimerizados y pueden incluir modificaciones a la estructura principal de fosfato-azúcar o bien al nucléosido. Las modificaciones en la estructura del ARN pueden diseñarse para permitir la inhibición específica. En una modalidad, las moléculas de ARNdh pueden modificarse a través de un proceso enzimático ubicuo de manera que puedan generarse las moléculas de ARNip. Este proceso enzimático puede utilizar una enzima ARNasa III como, por ejemplo, DICER en eucariotas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Véanse Elbashir *et al.* (2001) Nature 411:494-8; y Hamilton y Baulcombe (1999) Science 286(5441):950-2. Las enzimas DICER o ARNasa III funcionalmente equivalentes escinden hebras de ARNdh y/o moléculas de ARNhorq más grandes en oligonucleótidos más pequeños (por ejemplo, ARNip), cada uno de los cuales tiene una longitud de aproximadamente 19-25 nucleótidos. Las moléculas de ARNip producidas por estas enzimas tienen 2 a 3 nucleótidos protuberantes 3', y terminales de fosfato 5' e hidroxilo 3'. Las moléculas de ARNip generadas por las enzimas ARNasa III se desenrollan y se separan formando un ARN de una hebra en la célula. Las moléculas de ARNip luego se hibridan específicamente con ARN transcritos a partir de un gen objetivo y ambas moléculas de ARN se degradan posteriormente por un mecanismo de degradación de ARN celular inherente. Este proceso puede resultar en la degradación efectiva o la eliminación del ARN codificado por el gen objetivo en el organismo objetivo. El resultado es el silenciamiento postranscripcional del gen objetivo. En algunas modalidades, las moléculas de ARNip producidas por enzimas ARNasa III

endógenas a partir de moléculas de ácido nucleico heterólogas pueden mediar eficazmente la regulación negativa de genes objetivo en plagas de insectos.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico puede incluir al menos un polinucleótido no producido naturalmente que puede transcribirse a una molécula de ARN de una hebra capaz de formar una molécula de ARNdh *in vivo* a través de una hibridación intermolecular. Estos ARNdh generalmente se autoensamblan y pueden proporcionarse en la fuente de nutrición de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros o hemípteros) para lograr la inhibición postranscripcional de un gen objetivo. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico puede comprender dos polinucleótidos diferentes que no se producen naturalmente, cada uno de los cuales es específicamente complementario a un gen objetivo diferente en una plaga de insectos. Cuando una molécula de ácido nucleico de este tipo se proporciona como una molécula de ARNdh, por ejemplo, a una plaga de coleópteros y/o hemípteros, la molécula de ARNdh inhibe la expresión de al menos dos genes objetivo diferentes en la plaga.

C. Obtención de moléculas de ácido nucleico

Puede usarse una diversidad de polinucleótidos en las plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y hemípteros) como objetivos para el diseño de moléculas de ácido nucleico, como, por ejemplo, moléculas de ARNi y de ADN que codifican ARNi. Sin embargo, la selección de polinucleótidos nativos no es un proceso directo. Por ejemplo, solamente una pequeña cantidad de polinucleótidos nativos en una plaga de coleópteros o hemípteros serán objetivos efectivos. No se puede predecir con certeza si un polinucleótido nativo en particular puede regularse negativamente con efectividad por las moléculas de ácido nucleico de la invención, o si la regulación negativa de un polinucleótido nativo particular tendrá un efecto perjudicial en el crecimiento, la viabilidad, la alimentación y/o la supervivencia de una plaga de insectos. La gran mayoría de los polinucleótidos nativos de las plagas de coleópteros y hemípteros, como, por ejemplo, EST aisladas de ellos (por ejemplo, los polinucleótidos de plagas de coleópteros mencionados en la patente de los Estados Unidos 7,612,194) no tienen un efecto perjudicial en el crecimiento y/o la viabilidad de la plaga. Tampoco es predecible cuáles de los polinucleótidos nativos que pueden tener un efecto perjudicial en una plaga de insectos pueden usarse en técnicas recombinantes para expresar moléculas de ácido nucleico complementarias a dichos polinucleótidos nativos en una planta huésped y proporcionar el efecto perjudicial a la plaga cuando esta se alimenta sin causar daños a la planta huésped.

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ARNdh que se proporcionarán en la planta huésped de un insecto (por ejemplo, coleópteros o hemípteros) se seleccionan para dirigir las a ADNc que codifican proteínas o partes de proteínas esenciales para el desarrollo de las plagas, como, por ejemplo, polipéptidos que participan en las rutas bioquímicas metabólicas o catabólicas, la división celular, el metabolismo energético, la digestión, el reconocimiento de la planta huésped y similares. De acuerdo con lo descrito en la presente, la ingestión de las composiciones por un organismo plaga objetivo que contienen uno o más ARNdh, al menos un segmento del cual es específicamente complementario al menos a un segmento sustancialmente idéntico de ARN producido en las células del organismo plaga objetivo, puede resultar en la muerte u otra inhibición del objetivo. Un polinucleótido, ya sea ADN o ARN, derivado de una plaga de insectos puede usarse para construir células vegetales protegidas contra la infestación de plagas. La planta huésped de la plaga de coleópteros y/o hemípteros (por ejemplo, *Z. mays*, *B. napus* o *G. max*), por ejemplo, puede transformarse de manera que contenga uno o más polinucleótidos derivados de la plaga de coleópteros y/o hemípteros como se proporcionan en la presente. El polinucleótido transformado en el huésped puede codificar uno o más ARN que forman una estructura de ARNdh en las células o en los fluidos biológicos dentro del huésped transformado, con lo cual el ARNdh se torna disponible si/cuando la plaga forma una relación nutricional con el huésped transgénico. Ello puede resultar en la supresión de la expresión de uno o más genes en las células de la plaga y, finalmente, la muerte o la inhibición de su crecimiento o desarrollo.

En modalidades particulares, se fija como objetivo un gen que participa esencialmente en el crecimiento y desarrollo de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros o hemípteros). Otros genes objetivos para usar en la presente invención pueden incluir, por ejemplo, aquellos que desempeñan funciones importantes en la viabilidad, el movimiento, la migración, el crecimiento, el desarrollo, la infectividad, y el establecimiento de sitios de alimentación de la plaga. Por lo tanto, un gen objetivo puede ser un gen constitutivo o un factor de la transcripción. Adicionalmente, un polinucleótido nativo de una plaga de insectos para usar en la presente invención también puede derivarse de un homólogo (por ejemplo, un ortólogo) de un gen vegetal, viral, bacteriano o de insecto, cuya función es conocida por los expertos en la técnica, y cuyo polinucleótido es específicamente hibridable con un gen objetivo en el genoma de la plaga objetivo. Los métodos para identificar a un homólogo de un gen con una secuencia de nucleótidos conocida mediante hibridación son conocidos por los expertos en la técnica.

En algunas modalidades, la invención proporciona métodos para obtener una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido para producir una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNhorq). Una modalidad de este tipo comprende: (a) analizar uno o más genes objetivo para determinar su expresión, función y fenotipo ante la supresión génica mediada por ARNdh en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros o hemípteros); (b) sondear una biblioteca de ADNc o ADNg con una sonda que comprende la totalidad o una porción de un polinucleótido o un homólogo del mismo de una plaga objetivo que presenta un fenotipo de crecimiento o desarrollo alterado (por ejemplo, reducido) en un análisis de supresión mediada por ARNdh; (c) identificar un clon de ADN que se hibrida específicamente con la sonda; (d) aislar el clon de ADN identificado en el paso (b); (e) secuenciar el fragmento de ADNc o ADNg que comprende el clon aislado en el paso (d), en donde la molécula de ácido nucleico secuenciada comprende la totalidad o una porción sustancial del ARN o uno de sus homólogos; y (f) sintetizar químicamente la totalidad o una porción sustancial de un gen, o un ARNip, miARN, ARNhorq, ARNm, ARNhp, o ARNdh.

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 ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNhorq) incluye: (a) sintetizar los cebadores de los oligonucleótidos primero y segundo específicamente complementarios a una porción de un polinucleótido nativo de una plaga de insectos objetivo (por ejemplo, coleópteros o hemípteros); y (b) amplificar un inserto de ADNc o ADNg presente en un vector de clonación con el uso de los cebadores de los oligonucleótidos primero y segundo del paso (a), en donde la molécula de ácido nucleico amplificada comprende una porción sustancial de una molécula de ARNip, miARN, ARNhorq, ARNm, ARNhp, o ARNdh.

Los ácidos nucleicos pueden aislarse, amplificarse, o producirse mediante varios abordajes. Por ejemplo, una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNhorq) puede obtenerse mediante amplificación por PCR de un polinucleótido objetivo (por ejemplo, un gen objetivo o un polinucleótido no codificante transcrito objetivo) derivado de una biblioteca de ADNg o ADNc, o porciones de estos últimos. El ADN o ARN puede extraerse de un organismo objetivo, y las bibliotecas de ácido nucleico pueden prepararse a partir de tal ADN o ARN mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las bibliotecas de ADNg o ADNc generadas a partir de un organismo objetivo pueden usarse para la amplificación por PCR y la secuenciación de genes

objetivo. Un producto de PCR confirmado puede usarse como plantilla para la transcripción *in vitro* para generar ARN sentido y antisentido con promotores mínimos. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico pueden sintetizarse mediante cualquiera de varias técnicas (Véanse, por ejemplo, Ozaki *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research*, 20: 5205-5214; y Agrawal *et al.* (1990) *Nucleic Acids Research*, 18: 5419-5423), que incluyen el uso de un sintetizador de ADN automatizado (por ejemplo, un sintetizador de ADN/ARN modelo 392 o 394 de P.E. Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.)), con el uso de químicas estándar, como, por ejemplo, la química de la fosforamidita. Véanse, por ejemplo, Beaucage *et al.* (1992) *Tetrahedron*, 48: 2223-2311; las patentes de los Estados Unidos 4,980,460, 4,725,677, 4,415,732, 4,458,066, y 4,973,679. Alternativamente, también pueden emplearse las químicas que resultan en grupos de estructuras principales no naturales, como, por ejemplo, fosforotioato, fosforoamidato y similares.

Una molécula de ARN, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, o ARNhorq de la presente invención puede producirse química o enzimáticamente por un experto en la técnica a través de reacciones manuales o automatizadas, o *in vivo* en una célula que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica la molécula de ARN, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, o ARNhorq. El ARN puede producirse también mediante síntesis orgánica parcial o total- cualquier ribonucleótido modificado puede introducirse mediante síntesis enzimática u orgánica *in vitro*. Una molécula de ARN puede sintetizarse por una ARN polimerasa celular o una ARN polimerasa de bacteriófago (por ejemplo, ARN polimerasa T3, ARN polimerasa T7, y ARN polimerasa SP6). Los constructos de expresión útiles para la clonación y expresión de polinucleótidos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la publicación internacional PCT núm. WO97/32016; y las patentes de los Estados Unidos 5,593,874, 5,698,425, 5,712,135, 5,789,214, y 5,804,693. Las moléculas de ARN que se sintetizan químicamente o mediante síntesis enzimática *in vitro* pueden purificarse antes de su introducción en una célula. Por ejemplo, las moléculas de ARN pueden purificarse de una mezcla mediante la extracción con un solvente o una resina, precipitación, electroforesis, cromatografía, o una combinación de ellos. Alternativamente, las moléculas de ARN que se sintetizan químicamente o mediante síntesis enzimática *in vitro* pueden usarse con una purificación mínima o bien sin purificación alguna, por ejemplo, para evitar las pérdidas producidas por el procesamiento de la muestra. Las moléculas de ARN pueden secarse para su almacenamiento o disolverse en una solución acuosa. La solución puede contener tampones o sales para promover la hibridación y/o la estabilización de las hebras dúplex de la molécula de ARNdh.

En modalidades, una molécula de ARNdh puede formarse mediante una única hebra de ARN autocomplementaria o a partir de dos hebras de ARN complementarias. Las moléculas de ARNdh pueden sintetizarse *in vivo* o *in vitro*. Una ARN polimerasa endógena de la célula puede mediar la transcripción de dichas una o dos hebras de ARN *in vivo*, o la ARN polimerasa clonada puede usarse para mediar la transcripción *in vivo* o *in vitro*. La inhibición postranscripcional de un gen objetivo en una plaga de insectos puede ser dirigida por el huésped mediante la transcripción específica en un órgano, tejido o tipo celular del huésped (por ejemplo, con el uso de un promotor específico de tejido); la estimulación de una condición ambiental en el huésped (por ejemplo, con el uso de un promotor inducible que responde a la infección, el estrés, la temperatura y/o inductores químicos); y/o el diseño de la transcripción en una etapa del desarrollo o edad del huésped (por ejemplo, con el uso de un promotor específico de la etapa de desarrollo). Las hebras de ARN que forman una molécula de ARNdh, ya sea que se transcriban *in vitro* o *in vivo*, pueden ser poliadeniladas o no, y pueden ser capaces de traducirse a un polipéptido por el aparato de traducción de una célula o no pueden ser capaces de tal traducción.

15 D. Vectores recombinantes y transformación de la célula huésped

En algunas modalidades, la invención también proporciona una molécula de ADN para su introducción en una célula (por ejemplo, una célula bacteriana, una célula de levadura, o una célula vegetal), en donde la molécula de ADN comprende un polinucleótido que, al expresarse al ARN y ante la ingestión por una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), logra la supresión de un gen objetivo en una célula, un tejido, u órgano de la plaga. De este modo, algunas modalidades proporcionan una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un polinucleótido capaz de expresarse como una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNhorq) en una célula vegetal para inhibir la expresión del gen objetivo en una plaga de insectos. A los efectos de iniciar o mejorar la expresión, tales moléculas de ácido nucleico recombinantes pueden comprender uno o más elementos reguladores, que pueden unirse operativamente al polinucleótido capaz de expresarse como un ARNi. Los métodos para expresar una molécula de supresión de genes en plantas son conocidos, y pueden usarse para expresar un polinucleótido de la presente invención. Véanse, por ejemplo, la publicación internacional PCT núm. WO06/073727; y la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 2006/0200878 A1).

30 En las modalidades específicas, una molécula de ADN recombinante de la invención puede comprender un polinucleótido que codifica un ARN que puede formar una molécula de ARNdh. Tales

moléculas de ADN recombinante pueden codificar ARN que pueden formar moléculas de ARNdh capaces de inhibir la expresión de uno o más genes objetivo endógenos en una célula de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) al ser ingeridas. En muchas modalidades, un ARN transcrito puede formar una molécula de ARNdh que puede proporcionarse en forma estabilizada; por ejemplo, en una estructura de horquilla como también de tallo y bucle.

En modalidades alternativas, una hebra de una molécula de ARNdh puede formarse mediante la transcripción de un polinucleótido que es sustancialmente homólogo a un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 77, 79, 81, y un polinucleótido que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; los complementos de las SEC.

CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 77, 79, 81, y un polinucleótido que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 77, 79, 81, y un polinucleótido que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117 (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9, 83-85, 108-111, y 117); el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de

cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 77, 79, 81, y un polinucleótido que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9; un

fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* (por ejemplo, PB) que

comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; el complemento de un fragmento de al menos 15

nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; un polinucleótido

codificante nativo de un organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85.

En algunas modalidades, una hebra de una molécula de ARNdh puede formarse mediante la transcripción de un polinucleótido que es sustancialmente homólogo a un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9, 83-85, 108-111, y 117; el complemento de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9, 83-85, 108-111, y 117; fragmentos de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9, 83-85, 108-111, y 117; y los complementos de fragmentos de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9, 83-85, 108-111, y 117. En algunos ejemplos, el ARNdh se forma mediante la transcripción de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:124.

En modalidades particulares, una molécula de ADN recombinante que codifica un ARN que puede formar una molécula de ARNdh puede comprender una región codificante en donde al menos dos polinucleótidos se disponen de manera que un polinucleótido se halla en orientación con sentido y el otro polinucleótido se halla en orientación antisentido, con respecto a al menos un promotor, en donde el polinucleótido sentido y el polinucleótido antisentido se unen o conectan mediante un espaciador de, por ejemplo, aproximadamente cinco (~5) a aproximadamente mil (~1,000) nucleótidos. El espaciador puede formar un bucle entre los polinucleótidos sentido y antisentido. El polinucleótido sentido o el polinucleótido antisentido puede ser sustancialmente homólogo a un gen objetivo (por ejemplo, un gen *rpII215* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 108-111, y 117) o un fragmento de ellas. Sin embargo, en algunas modalidades, una molécula de ADN recombinante puede codificar un ARN que puede formar una molécula de ARNdh sin un espaciador. En las modalidades, un polinucleótido codificante sentido y un polinucleótido codificante antisentido pueden tener diferentes longitudes.

Los polinucleótidos identificados como poseedores de un efecto perjudicial sobre una plaga de insectos o un efecto protector vegetal con respecto a la plaga pueden incorporarse fácilmente a las

moléculas de ARNdh expresadas a través de la creación de casetes de expresión adecuados en una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención. Por ejemplo, dichos polinucleótidos pueden expresarse como una horquilla con la estructura de tallo y bucle al tomar un primer segmento correspondiente a un polinucleótido de gen objetivo (por ejemplo, un gen *rpII215* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 108-111, y 117, y fragmentos de cualquiera de los mencionados anteriormente); unir este polinucleótido a una segunda región espaciadora de segundo segmento que no es homóloga o complementaria al primer segmento; y unir este último a un tercer segmento, en donde al menos una porción del tercer segmento es sustancialmente complementaria al primer segmento. Este constructo forma una estructura de tallo y bucle mediante un apareamiento de bases intramolecular del primer segmento con el tercer segmento, en donde las formas de la estructura de bucle comprenden al segundo segmento. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes de los Estados Unidos núm. 2002/0048814 y 2003/0018993; y las publicaciones internacionales PCT núm. WO94/01550 y WO98/05770. Una molécula de ARNdh puede generarse, por ejemplo, en forma de una estructura de doble hebra como, por ejemplo, una estructura de tallo y bucle (por ejemplo, horquilla), mediante la cual se mejora la producción del ARNip dirigido a un polinucleótido nativo de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) mediante la coexpresión de un fragmento del gen objetivo, por ejemplo, en un casete de expresión en plantas adicional, que conduce a una mejor producción de ARNip, o reduce la metilación para evitar el silenciamiento génico transcripcional del promotor del ARNdh de horquilla.

Ciertas modalidades de la invención incluyen la introducción de una molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención en una planta (es decir, transformación) a los efectos de lograr niveles de expresión de una o más moléculas de ARNi que inhiban la plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Una molécula de ADN recombinante puede ser, por ejemplo, un vector como, por ejemplo, un plásmido lineal o circular cerrado. El sistema de vectores puede consistir en un único vector o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se introducirá en el genoma de un huésped. Además, un vector puede ser un vector de expresión. Los ácidos nucleicos de la invención pueden, por ejemplo, insertarse adecuadamente en un vector bajo el control de un promotor adecuado que funciona en uno o más huéspedes para conducir la expresión de un polinucleótido codificante unido u otro elemento de ADN. Muchos vectores se hallan disponibles para este fin, y la selección del vector adecuado dependerá principalmente del tamaño del ácido nucleico que se insertará en el vector y la célula huésped particular que se transformará con el vector.

Cada vector contiene diversos componentes según su función (por ejemplo, amplificación de ADN o expresión de ADN) y la célula huésped particular con la que es compatible.

A los efectos de conferir protección a una planta transgénica contra una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), un ADN recombinante puede, por ejemplo, transcribirse a una molécula de ARNi (por ejemplo, una molécula de ARN que forma una molécula de ARNdh) dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante. Una molécula de ARNi puede comprender un polinucleótido que es sustancialmente homólogo y específicamente hibridable a un polinucleótido transcrito correspondiente dentro de una plaga de insectos que puede dañar a la especie vegetal huésped. La plaga puede ponerse en contacto con la molécula de ARNi que se transcribe en las células de la planta huésped transgénica, por ejemplo, al ingerir las células o fluidos de la planta huésped transgénica que comprende la molécula de ARNi. De este modo, en los ejemplos particulares, la expresión de un gen objetivo es suprimida por la molécula de ARNi dentro de las plagas de coleópteros y/o hemípteros que infestan a la planta huésped transgénica. En algunas modalidades, la supresión de la expresión del gen objetivo en una plaga objetivo de coleópteros y/o hemípteros puede resultar en la protección de la planta contra el ataque de la plaga.

A los efectos de posibilitar la administración de las moléculas de ARNi a una plaga de insectos en una relación nutricional con una célula vegetal transformada con una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención, se requiere la expresión (es decir, transcripción) de las moléculas de ARNi en la célula vegetal. De este modo, una molécula de ácido nucleico recombinante puede comprender un polinucleótido de la invención operativamente unido a uno o más elementos reguladores, como, por ejemplo, un elemento promotor heterólogo que funciona en una célula huésped, como, por ejemplo, una célula bacteriana en donde se amplificará la molécula de ácido nucleico, y una célula vegetal en donde se expresará la molécula de ácido nucleico.

Los promotores adecuados para usar en las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen aquellos que son inducibles, virales, sintéticos, o constitutivos, todos los cuales son muy conocidos en la técnica. Los ejemplos no taxativos que describen a tales promotores incluyen las patentes de los Estados Unidos 6,437,217 (promotor RS81 del maíz); 5,641,876 (promotor de la actina del arroz); 6,426,446 (promotor RS324 del maíz); 6,429,362 (promotor PR-1 del maíz); 6,232,526 (promotor A3 del maíz); 6,177,611 (promotores constitutivos del maíz); 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196 (promotor 35S del CaMV); 6,433,252 (promotor de oleosina L3 del maíz); 6,429,357 (promotor 2 de actina del arroz, e intrón 2 de actina del arroz); 6,294,714 (promotores inducibles por

luz); 6,140,078 (promotores inducibles por sales); 6,252,138 (promotores inducibles por patógenos); 6,175,060 (promotores inducibles por deficiencia de fósforo); 6,388,170 (promotores bidireccionales); 6,635,806 (promotor de la gamma-coixina); y la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 2009/757,089 (promotor de la aldolasa del cloroplasto del maíz). Los promotores adicionales incluyen el promotor de la nopalina sintasa (NOS) (Ebert *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745-9) y los promotores de la octopina sintasa (OCS) (que se portan en plásmidos de *Agrobacterium tumefaciens* inductores de tumores); los promotores del caulimovirus como, por ejemplo, el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Lawton *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. 9:315-24); el promotor 35S del CaMV (Odell *et al.* (1985) Nature 313:810-2; el promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia (Walker *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19):6624-8); el promotor de la sacarosa sintasa (Yang y Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-8); el promotor del complejo de genes R (Chandler *et al.* (1989) Plant Cell 1:1175-83); el promotor del gen de la proteína de unión a la clorofila a/b; 35S del CaMV (Patentes de los Estados Unidos 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196); 35 del FMV (Patentes de los Estados Unidos 6,051,753, y 5,378,619); un promotor de PC1SV (Patente de los Estados Unidos 5,850,019); el promotor de SCP1 (Patente de los Estados Unidos 6,677,503); y promotores AGRtu.nos (núm. de acceso al 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 específico de tejido, como, por ejemplo, un promotor específico de las raíces. Los promotores específicos de las raíces conducen la expresión de polinucleótidos codificantes operativamente unidos exclusiva o preferentemente en el tejido radicular. Los ejemplos de promotores específicos de las raíces son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos 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 plagas de coleópteros de acuerdo con la invención puede clonarse entre dos promotores específicos de las raíces orientados en direcciones de transcripción opuestas respecto al polinucleótido o fragmento, y que son operables en una célula vegetal transgénica y se expresan allí para producir moléculas de ARN en la célula vegetal transgénica que posteriormente pueden formar moléculas de ARNdh, de acuerdo con lo descrito, *supra*. Las moléculas de ARNi expresadas en los tejidos

vegetales pueden ser ingeridas por una plaga de insectos de manera que puede lograrse la supresión de la expresión del gen objetivo.

Los elementos reguladores adicionales que opcionalmente pueden unirse operativamente a un ácido nucleico incluyen 5'UTR ubicadas entre un elemento promotor y un polinucleótido codificante que funcionan como elemento líder de la traducción. El elemento líder de la traducción se halla presente en el ARNm completamente procesado, y puede afectar el procesamiento del transcrito primario y/o la estabilidad del ARN. Los ejemplos de elementos líderes de la traducción incluyen los líderes de proteínas de choque térmico del maíz y petunia (Patente de los Estados Unidos 5,362,865), líderes de proteínas de la cubierta de virus de plantas, líderes de rubisco de plantas, y otros. Véanse, por ejemplo, Turner y Foster (1995) *Molecular Biotech.* 3(3):225-36. Los ejemplos no taxativos de 5'UTR incluyen GmHsp (Patente de los Estados Unidos 5,659,122); PhDnaK (Patente de los Estados Unidos 5,362,865); AtAnt1; TEV (Carrington y Freed (1990) *J. Virol.* 64:1590-7); y AGRtunos (núm. de acceso al GenBank™. V00087; y Bevan *et al.* (1983) *Nature* 304:184-7).

Los elementos reguladores adicionales que pueden opcionalmente unirse operativamente a un ácido nucleico también incluyen elementos no traducidos en 3', regiones de terminación de la transcripción 3', o regiones de poliadenilación. Ellos son elementos genéticos ubicados corriente abajo de un polinucleótido e incluyen polinucleótidos que proporcionan una señal de poliadenilación, y/u otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción o el procesamiento del ARNm. Las señales de poliadenilación funcionan en las plantas para causar la adición de nucleótidos de poliadenilato al extremo 3' del precursor del ARNm. El elemento de poliadenilación puede derivarse de una diversidad de genes vegetales, o de genes de T-ADN. Un ejemplo no taxativo de una región de terminación de la transcripción 3' es la región 3' de nopalina sintasa (nos 3'; Fraley *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7). Un ejemplo del uso de diferentes regiones no traducidas 3' se proporciona en Ingelbrecht *et al.*, (1989) *Plant Cell* 1:671-80. Los ejemplos no taxativos de señales de poliadenilación incluyen una de un gen de RbcS2 de *Pisum sativum* (Ps.RbcS2-E9; Coruzzi *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:1671-9) y AGRtu.nos (núm. de acceso al GenBank™ E01312).

Algunas modalidades pueden incluir un vector de transformación de plantas que comprende una molécula de ADN aislada y purificada que comprende al menos uno de los elementos reguladores descritos anteriormente operativamente unido a uno o más polinucleótidos de la presente invención.

Cuando se expresan, el uno o más polinucleótidos resultan en una o más moléculas de ARNi que comprenden un polinucleótido que es específicamente complementario a la totalidad o parte de una

molécula de ARN nativa en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). De este modo, el polinucleótido puede comprender un segmento que codifica la totalidad o parte de un polirribonucleótido presente dentro de un transcrito de ARN objetivo de la plaga de coleópteros y/o hemípteros y puede comprender repeticiones invertidas de la totalidad o parte de un transcrito objetivo de la plaga. Un vector de transformación de plantas puede contener polinucleótidos específicamente complementarios a más de un polinucleótido objetivo, por lo que permite de este modo la producción de más de un ARNdh para inhibir la expresión de dos o más genes en células de una o más poblaciones o especies de plagas de insectos objetivo. Los segmentos de polinucleótidos específicamente complementarios a polinucleótidos presentes en diferentes genes pueden combinarse para formar una única molécula de ácido nucleico compuesta para la expresión en una planta transgénica. Estos segmentos pueden ser contiguos o separados por un espaciador.

En otras modalidades, un plásmido de la presente invención que ya contiene al menos un polinucleótido de la invención puede modificarse mediante la inserción secuencial de uno o más polinucleótidos adicionales en el mismo plásmido, en donde el polinucleótido adicional se halla operativamente unido a los mismos elementos reguladores que el al menos un polinucleótido original. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico puede diseñarse para la inhibición de múltiples genes objetivo. En algunas modalidades, los múltiples genes que se inhibirán pueden obtenerse de la misma especie de plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros o hemípteros), lo que puede mejorar la efectividad de la molécula de ácido nucleico. En otras modalidades, los genes pueden derivarse de diferentes plagas de insectos, lo que puede ampliar el rango de plagas contra las que el o los agentes son efectivos. Cuando múltiples genes se fijan como objetivo para la supresión o una combinación de expresión y supresión, puede diseñarse un elemento de ADN policistrónico.

Una molécula de ácido nucleico recombinante o vector de la presente invención puede comprender un marcador de selección que confiere un fenotipo seleccionable en una célula transformada, como, por ejemplo, una célula vegetal. Los marcadores de selección también pueden usarse para seleccionar plantas o células vegetales que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención. El marcador puede codificar resistencia a biocidas, resistencia a antibióticos (por ejemplo, kanamicina, Geneticine (G418), bleomicina, higromicina, *etc.*), o tolerancia a herbicidas (por ejemplo, glifosato, *etc.*). Los ejemplos de marcadores de selección incluyen, en forma no taxativa: un gen *neo* que codifica la resistencia a kanamicina y puede seleccionarse con el uso de kanamicina, G418, *etc.*; un gen *bar* que codifica para la resistencia a bialafos; un gen de EPSP sintasa mutante que codifica la

tolerancia al glifosato; un gen de *nitrilasa* que confiere resistencia a bromoxinilo; un gen de acetolactato sintasa mutante (*ALS*) que confiere tolerancia a imidazolinona o sulfonilurea; y un gen *DHFR* de resistencia al metotrexato. Se hallan disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina, espectinomina, rifampicina, estreptomicina y tetraciclina, y similares. Los ejemplos de tales marcadores de selección se ilustran, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos 5,550,318; 5,633,435; 5,780,708 y 6,118,047.

Una molécula de ácido nucleico recombinante o vector de la presente invención también puede incluir un marcador cribable. Los marcadores cribables pueden usarse para monitorear la expresión. Los marcadores cribables ejemplares incluyen un gen *uidA* o de β -glucuronidasa (GUS) que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos (Jefferson *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405); un gen del locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos vegetales (Dellaporta *et al.* (1988) "Molecular cloning of the maize *R-nj* allele by transposon tagging with *Ac*." 18^o Stadler Genetics Symposium, P. Gustafson y R. Appels, eds. (Nueva York: Plenum), páginas 263-82); un gen de β -lactamasa (Sutcliffe *et al.* (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3737-41); un gen que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen de luciferasa (Ow *et al.* (1986) Science 234:856-9); un gen *xylE* que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir catecoles cromogénicos (Zukowski *et al.* (1983) Gene 46(2-3):247-55); un gen de amilasa (Ikata *et al.* (1990) Bio/Technol. 8:241-2); un gen de tirosinasa que codifica una enzima capaz de oxidar tirosina a DOPA y dopaquinona, que a su vez se condensa a melanina (Katz *et al.* (1983) J. Gen. Microbiol. 129:2703-14); y una α -galactosidasa.

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico recombinantes, de acuerdo con lo descrito *supra*, pueden usarse en métodos para la creación de plantas transgénicas y la expresión de ácidos nucleicos heterólogos en plantas para preparar plantas transgénicas que presentan susceptibilidad reducida a plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Los vectores de transformación de plantas pueden prepararse, por ejemplo, mediante la inserción de moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de ARNi en vectores de transformación de plantas y su introducción en plantas.

Los métodos adecuados para la transformación de células huésped incluyen cualquier método mediante el cual puede introducirse ADN en una célula, como, por ejemplo, mediante la

transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 5,508,184), mediante captación de ADN mediada por inhibición/disecado (Véase, por ejemplo, Potrykus *et al.* (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183-8), mediante electroporación (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 5,384,253), mediante agitación con fibras de carburo de silicio (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos 5,302,523 y 5,464,765), transformación mediada por *Agrobacterium* (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos 5,563,055; 5,591,616; 5,693,512; 5,824,877; 5,981,840; y 6,384,301) y aceleración de partículas recubiertas con ADN (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos 5,015,580; 5,550,318; 5,538,880; 6,160,208; 6,399,861; y 6,403,865), *etc.* Las técnicas particularmente útiles para transformar el maíz se encuentran descritas, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos 7,060,876 y 5,591,616; y en la publicación internacional PCT WO95/06722. Mediante la aplicación de técnicas como estas, las células de prácticamente cualquier especie pueden transformarse de manera estable. En algunas modalidades, el ADN transformante se integra en el genoma de la célula huésped. En el caso de especies multicelulares, las células transgénicas pueden regenerarse en un organismo transgénico. Cualquiera de estas técnicas puede usarse para producir una planta transgénica, por ejemplo, que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican una o más moléculas de ARNi en el genoma de la planta transgénica.

El método utilizado más ampliamente para introducir un vector de expresión en 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 transforman genéticamente las células vegetales. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta. Los plásmidos Ti (inductores de tumores) contienen un segmento grande, conocido como T-ADN, que se transfiere a plantas transformadas. Otro segmento del plásmido Ti, la región Vir, es responsable de la transferencia del T-ADN. La región del T-ADN se encuentra limitada por repeticiones terminales. En los vectores binarios modificados, los genes inductores de tumores se han eliminado y las funciones de la región Vir se utilizan para transferir ADN extraño limitado por los elementos limítrofes del T-ADN. La región de T también puede contener un marcador de selección para la recuperación eficaz de células y plantas transgénicas y un sitio de clonación múltiple para insertar polinucleótidos para la transferencia como, por ejemplo, de un ácido nucleico que codifica ARNdh.

En modalidades particulares, un vector de transformación de plantas se deriva de un plásmido Ti de *A. tumefaciens* (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos 4,536,475, 4,693,977, 4,886,937 y 5,501,967; y la patente de invención europea núm. EP 0 122 791) o un plásmido Ri de *A. rhizogenes*. Los vectores de transformación de plantas adicionales incluyen, por ejemplo, en forma no taxativa, aquellos 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 de invención europea núm. EP 0 120 516, y aquellos derivados de cualquiera de los mencionados anteriormente. Otras bacterias como, por ejemplo, *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, y *Mesorhizobium* que interactúan con plantas naturalmente pueden modificarse para mediar la transferencia génica a una cantidad de diversas plantas. Estas bacterias simbióticas asociadas a plantas pueden hacerse competentes para la transferencia génica mediante la adquisición de un plásmido Ti desarmado y un vector binario adecuado.

Luego de proporcionar ADN exógeno a las células receptoras, las células transformadas se identifican generalmente para el cultivo posterior y la regeneración de plantas. A los efectos de mejorar la capacidad para identificar células transformadas, puede desearse emplear un gen marcador de selección o cribable, de acuerdo con lo establecido anteriormente, con el vector de transformación usado para generar el transformante. En el caso en el que se usa un marcador de selección, las células transformadas se identifican dentro de la población de células potencialmente transformadas mediante la exposición de las células a uno o más agentes de selección. En el caso en el que se usa un marcador cribable, las células pueden cribarse para detectar el rasgo de gen marcador deseado.

Las células que sobreviven a la exposición al agente de selección o las células que obtuvieron un puntaje positivo en un ensayo de cribaje, pueden cultivarse en medios que soportan la regeneración de plantas. En algunas modalidades, se puede modificar cualquier medio de cultivo de tejidos vegetales adecuados (por ejemplo, medios MS y N6) mediante la inclusión de otras sustancias como, por ejemplo, reguladores del crecimiento. El tejido puede mantenerse en un medio básico con reguladores del crecimiento hasta que se halle tejido suficiente disponible para comenzar los esfuerzos de regeneración de plantas, o siguiendo repetidas rondas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración (por ejemplo, al menos 2 semanas), y luego se transfiere a un medio que conduce a la formación de brotes. Los cultivos se transfieren periódicamente hasta que se produce una formación de brotes suficientes. Una vez formados los brotes, estos se transfieren a un

medio que conduce a la formación de raíces. Una vez que se han formado suficientes raíces, las plantas pueden transferirse al suelo para un mayor crecimiento y maduración.

A los efectos de confirmar la presencia de una molécula de ácido nucleico de interés (por ejemplo, un ADN que codifica una o más moléculas de ARNi que inhiben la expresión del gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros en las plantas que están en la etapa de regeneración, puede realizarse una diversidad de ensayos. Estos ensayos incluyen, por ejemplo: ensayos biológicos moleculares, como, por ejemplo, transferencia Southern y northern, PCR, y secuenciación de ácidos nucleicos; ensayos bioquímicos, como, por ejemplo, la detección de la presencia de un producto de proteína, por ejemplo, mediante medios inmunológicos (ELISA y/o transferencias western) o mediante función enzimática; ensayos de partes de plantas, como, por ejemplo, ensayos de hojas o raíces; y análisis del fenotipo de toda la planta regenerada.

Se pueden analizar los eventos de integración, por ejemplo, mediante la amplificación por PCR con el uso, por ejemplo, de cebadores oligonucleótidos específicos para una molécula de ácido nucleico de interés. Se entiende que el genotipado por PCR incluye, en forma no taxativa, la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN_g derivado de tejido aislado de callo de una planta huésped de la que se predijo que contenía una molécula de ácido nucleico de interés integrada en el genoma, seguido por una clonación estándar y un análisis de secuencias de los productos de amplificación por PCR. Los métodos de genotipado por PCR se encuentran bien descritos (por ejemplo, Rios *et al.* (2002) Plant J. 32:243-53) y pueden aplicarse al ADN_g derivado de cualquier especie vegetal (por ejemplo, *Z. mays* o *G. max*) o tipo tisular, con inclusión de cultivos celulares.

Una planta transgénica formada con el uso de métodos de transformación dependientes de *Agrobacterium* generalmente contiene un único ADN recombinante insertado en un cromosoma. El polinucleótido del único ADN recombinante se menciona como un "evento transgénico" o "evento de integración". Estas plantas transgénicas son heterocigotas para el polinucleótido exógeno insertado.

En algunas modalidades, puede obtenerse una planta transgénica homocigota con respecto a un transgen mediante el apareamiento sexual (autofertilización) de una planta transgénica segregante independiente que contiene un único gen exógeno consigo, por ejemplo, una planta T₀, para producir una semilla T₁. Un cuarto de la semilla T₁ producida será homocigota con respecto al transgen. La germinación de la semilla T₁ resulta en plantas que pueden someterse a prueba para determinar la heterocigosidad, generalmente con el uso de un ensayo de SNP o un ensayo de amplificación térmica que permite la distinción entre heterocigotas y homocigotas (es decir, un ensayo de la cigosidad).

En modalidades particulares, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más moléculas de ARNi diferentes se producen en una célula vegetal que tiene un efecto inhibidor de la plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Las moléculas de ARNi (por ejemplo, moléculas de ARNdh) pueden expresarse a partir de múltiples ácidos nucleicos introducidos en diferentes eventos de transformación o de un único ácido nucleico introducido en un único evento de transformación. En algunas modalidades, se expresa una pluralidad de moléculas de ARNi bajo el control de un único promotor. En otras modalidades, se expresa una pluralidad de moléculas de ARNi bajo el control de múltiples promotores. Se pueden expresar moléculas de ARNi únicas que comprenden múltiples polinucleótidos cada uno de los cuales es homólogo a diferentes loci dentro de una o más plagas de insectos (por ejemplo, los loci definidos por las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 77, 79, 81 y un polinucleótido que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117 (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107)), ambos en diferentes poblaciones de la misma especie de plaga de insectos, o en especies diferentes de plagas de insectos.

Además de la transformación directa de una planta con una molécula de ácido nucleico recombinante, las plantas transgénicas pueden prepararse mediante el cruzamiento de una primera planta que tiene al menos un evento transgénico con una segunda planta que carece de tal evento. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ARNi puede introducirse en una primera línea vegetal que es propensa a la transformación para producir una planta transgénica, cuya planta transgénica puede cruzarse con una segunda línea vegetal para introgresar el polinucleótido que codifica la molécula de ARNi en la segunda línea vegetal.

En algunos aspectos, se incluyen las semillas y los productos básicos producidos por las plantas transgénicas derivadas de células vegetales transformadas, en donde las semillas o los productos básicos comprenden una cantidad detectable de un ácido nucleico de la invención. En algunas modalidades, estos productos básicos pueden producirse, por ejemplo, mediante la obtención de plantas transgénicas y la preparación de alimento o pienso a partir de ellas. Los productos básicos que comprenden uno o más de los polinucleótidos de la invención incluyen, por ejemplo, en forma no taxativa: harinas, aceites, granos triturados o enteros o semillas de una planta, y cualquier producto alimenticio que comprenda cualquier harina, aceite, grano triturado o entero de una planta o semilla recombinante que comprende uno o más de los ácidos nucleicos de la invención. La detección de uno o más de los polinucleótidos de la invención en uno o más artículos o productos básicos es una prueba

de facto de que el artículo o producto básico se produce a partir de una planta transgénica diseñada para expresar una o más de las moléculas de ARNi de la invención a los efectos de controlar plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros).

En algunas modalidades, una planta transgénica o una semilla transgénica que comprende una
5 molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender también al menos otro evento transgénico en su genoma, que incluye en forma no taxativa: un evento transgénico a partir del cual se transcribe una molécula de ARNi dirigida a un locus en una plaga de coleópteros o hemípteros diferente a la definida por la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79,
10 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81, y un polinucleótido que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117, como, por ejemplo, uno o más loci seleccionados del grupo que consiste en *Caf1-180* (publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2012/0174258); *VatpaseC* (publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2012/0174259); *Rho1* (publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2012/0174260); *VatpaseH* (publicación de
15 solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2012/0198586); *PPI-87B* (publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2013/0091600); *RPA70* (publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2013/0091601); *RPS6* (publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2013/0097730); *ARN polimerasa II* (solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/133214); *ARN polimerasa II33* (solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/133210); *ROP*
20 (solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 14/577,811); *RNAPIII40* (solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 14/577,854); *Dre4* (solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 14/705,807); *ncm* (solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/095487); *COPI alpha* (solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/063,199); *COPI beta* (solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/063,203); *COPI gamma* (solicitud de patente de los Estados Unidos núm.
25 62/063,192); y *COPI delta* (62/063,216); un evento transgénico a partir del cual se transcribe una molécula de ARNi dirigida a un gen en un organismo diferente a una plaga de coleópteros y/o hemípteros (por ejemplo, un nemátodo parásito de plantas); un gen que codifica una proteína insecticida (por ejemplo, una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*, y un polipéptido PIP-1); un gen de tolerancia a herbicidas (por ejemplo, un gen que proporciona tolerancia al glifosato); y un
30 gen que contribuye a un fenotipo deseable en la planta transgénica, como, por ejemplo, mayor rendimiento, metabolismo de ácidos grasos alterado, o restauración de la esterilidad masculina

citoplasmática. En modalidades particulares, los polinucleótidos que codifican moléculas de ARNi de la invención pueden combinarse con otros rasgos de enfermedades y control de insectos en una planta para lograr los rasgos deseados a fin de mejorar el control de la enfermedad de una planta y el daño provocado por los insectos. La combinación de rasgos de control de insectos que emplean modos de acción distintos puede proporcionar plantas transgénicas protegidas con una durabilidad superior respecto a las plantas que alojan un único rasgo de control, por ejemplo, en virtud de la menor probabilidad de que se desarrolle la resistencia al rasgo en el campo.

V. Supresión del gen objetivo en una plaga de insectos

A. Descripción general

En algunas modalidades de la invención, puede proporcionarse al menos una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) a una plaga de insectos, en donde la molécula de ácido nucleico conduce al silenciamiento génico mediado por la iARN en la plaga. En modalidades particulares, puede proporcionarse una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNhorq) a una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En algunas modalidades, puede proporcionarse una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de insectos a una plaga mediante el contacto de la molécula de ácido nucleico con la plaga. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de insectos puede proporcionarse en un sustrato de alimentación de la plaga, por ejemplo, una composición nutritiva. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico útil para el control de una plaga de insectos puede proporcionarse a través de la ingestión de material vegetal que comprende la molécula de ácido nucleico que es ingerida por la plaga. En ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico se halla presente en un material vegetal a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante introducido en el material vegetal, por ejemplo, por la transformación de una célula vegetal con un vector que comprende el ácido nucleico recombinante y la regeneración de un material vegetal o una planta entera a partir de la célula vegetal transformada.

En algunas modalidades, se pone en contacto una plaga con la molécula de ácido nucleico que conduce al silenciamiento génico mediado por la iARN en la plaga a través del contacto con una composición tópica (por ejemplo, una composición aplicada mediante atomización) o un cebo de iARN. Los cebos de iARN se forman cuando el ARNdh se mezcla con alimento, un atrayente o ambos. Cuando las plagas ingieren el cebo, también consumen el ARNdh. Los cebos pueden tomar forma de gránulos, geles, polvos fluibles, líquidos o sólidos. En modalidades particulares, puede

incorporarse *rpII215* en una formulación de cebo como, por ejemplo, la descrita en la patente de los Estados Unidos núm. 8,530,440 que se incorpora a la presente a modo de referencia. Generalmente, con los cebos, los cebos se colocan en el ambiente de la plaga de insectos o en sus alrededores, por ejemplo, el WCR puede ponerse en contacto con el cebo, y/o ser atraído por el cebo.

5 B. Supresión del gen objetivo mediada por la iARN

En ciertas modalidades, la invención proporciona moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNhorq) que pueden diseñarse para dirigirlas a polinucleótidos nativos esenciales (por ejemplo, genes esenciales) en el transcriptoma de una plaga de insectos (por ejemplo, un coleóptero (por ejemplo, WCR, NCR, SCR, y PB) o hemíptero (por ejemplo, BSB), por ejemplo, mediante el diseño de una molécula de ARNi que comprende al menos una hebra que comprende un polinucleótido que es específicamente complementario al polinucleótido objetivo. La secuencia de una molécula de ARNi diseñada de ese modo puede ser idéntica a la del polinucleótido objetivo, o puede incorporar faltas de coincidencia que no evitan la hibridación específica entre la molécula de ARNi y su polinucleótido objetivo.

15 Las moléculas de ARNi de la invención pueden usarse en los métodos para la supresión génica en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), con lo cual se reduce el nivel o la incidencia del daño causado por la plaga en una planta (por ejemplo, una planta transformada protegida que comprende una molécula de ARNi). De acuerdo con su uso en la presente, el término "supresión génica" se refiere a cualquiera de los métodos muy conocidos para la reducción de los niveles de proteínas producidas como resultado de la transcripción génica al ARNm y la posterior traducción del ARNm, que incluye la reducción de la expresión de la proteína de un gen o un polinucleótido codificante que incluye la inhibición postranscripcional de la expresión y la supresión transcripcional. La inhibición postranscripcional es mediada por la homología específica entre la totalidad o parte de un ARNm transcrito a partir de un gen objetivo de la supresión y la correspondiente molécula de ARNi usada para la supresión. Adicionalmente, la inhibición postranscripcional se refiere a la reducción considerable y mensurable de la cantidad de ARNm disponible en la célula para la unión a ribosomas.

En algunas modalidades en donde una molécula de ARNi es una molécula de ARNdh, la molécula de ARNdh puede escindirse por la enzima, DICER, en moléculas cortas de ARNip (de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud). La molécula de ARNip de doble hebra generada por la actividad de DICER sobre la molécula de ARNdh puede separarse en dos ARNip de una hebra; la "hebra pasajera"

y la "hebra guía". La hebra pasajera puede degradarse y la hebra guía puede incorporarse a RISC. La inhibición postranscripcional se produce mediante la hibridación específica de la hebra guía con un polinucleótido específicamente complementario de una molécula de ARNm, y la posterior escisión por la enzima, Argonauta (componente catalítico del complejo RISC).

- 5 En otras modalidades de la invención, puede usarse cualquier forma de molécula de ARNi. Los expertos en la técnica entenderán que las moléculas de ARNd_h generalmente son más estables durante la preparación y durante el paso de provisión de la molécula de ARNi a una célula que las moléculas de ARN de una hebra, y generalmente también son más estables en una célula. De este modo, mientras que las moléculas de ARNi_p y miARN, por ejemplo, pueden ser igualmente efectivas en
- 10 algunas modalidades, puede elegirse una molécula de ARNd_h debido a su estabilidad.

En modalidades particulares, se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido, cuyo polinucleótido puede expresarse *in vitro* para producir una molécula de ARNi que es sustancialmente homóloga a una molécula de ácido nucleico codificada por un polinucleótido dentro del genoma de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). En ciertas

15 modalidades, la molécula de ARNi transcrita *in vitro* puede ser una molécula de ARNd_h estabilizada que comprende una estructura de tallo y bucle. Luego de que una plaga de insectos se pone en contacto con la molécula de ARNi transcrita *in vitro*, puede producirse la inhibición postranscripcional de un gen objetivo en la plaga (por ejemplo, un gen esencial).

En algunas modalidades de la invención, la expresión de una molécula de ácido nucleico que

20 comprende al menos 15 nucleótidos contiguos (por ejemplo, al menos 19 nucleótidos contiguos) de un polinucleótido se usa en un método para la inhibición postranscripcional de un gen objetivo en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), en donde el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3;

25 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9; un polinucleótido que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117 (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107); el

30 complemento de un polinucleótido que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108; SEC.

CON NÚM. DE IDENT.:109; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:109; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:110; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:110; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:111; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:111; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:117; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:117; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, y 5; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, y 5; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108-111 y 117; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:84; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:84; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, y 81; el

complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, y 81; un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC.

5 CON NÚM. DE IDENT.:83-85; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85. En ciertas modalidades, puede usarse la

10 expresión de una molécula de ácido nucleico que es al menos aproximadamente 80 % idéntica (por ejemplo, 79 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %,

15 aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 100 %, y 100 %) con cualquiera de las mencionadas anteriormente. En estas y otras modalidades, puede expresarse una molécula de ácido nucleico que se hibrida específicamente a una molécula de ARN presente en al menos una célula de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros).

20 Constituye una característica importante de algunas modalidades de la presente que el sistema de inhibición postranscripcional por iARN puede tolerar variaciones de secuencias entre genes objetivo que podrían esperarse debido a la mutación genética, el polimorfismo de las cepas, o la divergencia evolutiva. La molécula de ácido nucleico introducida puede no necesitar ser absolutamente homóloga a un producto de transcripción primario o un ARNm procesado completamente de un gen objetivo,

25 con la condición de que la molécula de ácido nucleico introducida sea específicamente hibridable a un producto de transcripción primario o a un ARNm procesado completamente del gen objetivo. Por otra parte, la molécula de ácido nucleico introducida puede no necesitar ser de longitud completa, respecto a un producto de transcripción primario o bien respecto a un ARNm procesado completamente del gen objetivo.

30 La inhibición de un gen objetivo con el uso de la tecnología de ARNi de la presente invención es específica de secuencias; es decir, los polinucleótidos sustancialmente homólogos a las moléculas de

ARNi son objetivos para la inhibición genética. En algunas modalidades, una molécula de ARN que comprende un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la de una porción de un gen objetivo puede usarse para la inhibición. En estas y otras modalidades, puede usarse una molécula de ARN que comprende un polinucleótido con una o más mutaciones puntuales, inserciones, y/o eliminaciones respecto a un polinucleótido objetivo. En modalidades particulares, una molécula de ARNi y una porción de un gen objetivo pueden compartir una identidad de secuencias, por ejemplo, al menos de aproximadamente 80 %, al menos de aproximadamente 81 %, al menos de aproximadamente 82 %, al menos de aproximadamente 83 %, al menos de aproximadamente 84 %, al menos de aproximadamente 85 %, al menos de aproximadamente 86 %, al menos de aproximadamente 87 %, al menos de aproximadamente 88 %, al menos de aproximadamente 89 %, al menos de aproximadamente 90 %, al menos de aproximadamente 91 %, al menos de aproximadamente 92 %, al menos de aproximadamente 93 %, al menos de aproximadamente 94 %, al menos de aproximadamente 95 %, al menos de aproximadamente 96 %, al menos de aproximadamente 97 %, al menos de aproximadamente 98 %, al menos de aproximadamente 99 %, al menos de aproximadamente 100 %, y 100 %. Alternativamente, la región dúplex de una molécula de ARNdh puede ser específicamente hibridable con una porción de un transcrito de gen objetivo. En las moléculas específicamente hibridables, un polinucleótido de longitud menor a la longitud completa que presenta una mayor homología compensa a un polinucleótido de mayor longitud, menos homólogo. La longitud del polinucleótido de una región dúplex de una molécula de ARNdh que es idéntica a una porción de un transcrito de gen objetivo puede tener al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, o al menos aproximadamente 1,000 bases. En algunas modalidades, puede usarse un polinucleótido de más de 20-100 nucleótidos. En modalidades particulares, puede usarse un polinucleótido de más de aproximadamente 200-300 nucleótidos. En modalidades particulares, puede usarse un polinucleótido de más de aproximadamente 500-1,000 nucleótidos, según el tamaño del gen objetivo.

En ciertas modalidades, la expresión de un gen objetivo en una plaga (por ejemplo, coleópteros o hemípteros) puede inhibirse en al menos 10 %; al menos 33 %; al menos 50 %; o al menos 80 % dentro de una célula de la plaga, de manera que se produzca una inhibición significativa. La inhibición significativa se refiere a la inhibición respecto a un umbral que resulta en un fenotipo detectable (por ejemplo, cese del crecimiento, cese de la alimentación, cese del desarrollo, mortalidad inducida, *etc.*), o una disminución detectable en un producto génico y/o ARN correspondiente al gen objetivo que se

inhibe. Aunque, en ciertas modalidades de la invención, se produce la inhibición en sustancialmente todas las células de la plaga, en otras modalidades la inhibición se produce solamente en un subconjunto de células que expresan el gen objetivo.

En algunas modalidades, la supresión transcripcional es mediada por la presencia en una célula de una molécula de ARNdh que presenta una identidad de secuencias sustancial con respecto a un ADN promotor o su complemento para efectuar lo que se menciona como "transupresión del promotor". La supresión génica puede ser efectiva contra genes objetivo en una plaga de insectos que puede ingerir o ponerse en contacto con las moléculas de ARNdh, por ejemplo, mediante la ingestión o el contacto con el material vegetal que contiene las moléculas de ARNdh. Las moléculas de ARNdh para usar en la transupresión de promotores pueden diseñarse específicamente para inhibir o suprimir la expresión de uno o más polinucleótidos homólogos o complementarios en las células de la plaga de insectos. La supresión génica postranscripcional mediante ARN con orientación sentido o antisentido para regular la expresión génica en células vegetales se halla descrita en las patentes de los Estados Unidos 5,107,065; 5,759,829; 5,283,184; y 5,231,020.

C. Expresión de moléculas de ARNi proporcionadas a una plaga de insectos

La expresión de moléculas de ARNi para la inhibición génica mediada por la iARN en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) puede realizarse en cualquiera de varios formatos *in vitro* o *in vivo*. Las moléculas de ARNi pueden proporcionarse entonces a una plaga de insectos, por ejemplo, mediante el contacto de las moléculas de ARNi con la plaga, o haciendo que la plaga ingiera o de otro modo internalice las moléculas de ARNi. Algunas modalidades incluyen plantas huéspedes transformadas de una plaga de coleópteros y/o hemípteros, células vegetales transformadas, y la progenie de plantas transformadas. Las células vegetales transformadas y las plantas transformadas pueden diseñarse para que expresen una o más de las moléculas de ARNi, por ejemplo, bajo el control de un promotor heterólogo, a los efectos de proporcionar un efecto protector contra la plaga. De este modo, cuando una planta transgénica o una célula vegetal transgénica es consumida por una plaga de insectos durante la alimentación, la plaga puede ingerir moléculas de ARNi expresadas en las plantas transgénicas o en las células transgénicas. Los polinucleótidos de la presente invención también pueden introducirse en una amplia diversidad de microorganismos huéspedes procariotas y eucariotas para producir moléculas de ARNi. El término "microorganismo" incluye especies procariotas y eucariotas, como, por ejemplo, bacterias y hongos.

La modulación de la expresión génica puede incluir la supresión parcial o completa de la expresión. En otra modalidad, un método para suprimir la expresión génica en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) comprende proporcionar en el tejido del huésped de la plaga una cantidad supresora de genes de al menos una molécula de ARNdh formada luego de la transcripción de un polinucleótido como el descrito en la presente, del cual al menos un segmento es complementario a un ARNm dentro de las células de la plaga de insectos. Una molécula de ARNdh, que incluye su forma modificada como, por ejemplo, una molécula de ARNip, miARN, ARNhp, o ARNhorq, ingerida por una plaga de insectos puede ser al 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 % idéntica a una molécula de ARN transcrita a partir de una molécula de ADN de *rpII215*, por ejemplo, que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5, 7-9, 77, 79, 81, 83-85, 108-111, y 117. Por lo tanto, se proporcionan moléculas de ácido nucleico sustancialmente purificadas que incluyen, en forma no taxativa, polinucleótidos no producidos naturalmente y constructos de ADN recombinante para proporcionar ARNdh, que suprimen o inhiben la expresión de un polinucleótido codificante endógeno o un polinucleótido codificante objetivo en una plaga de insectos cuando se introducen en la plaga.

Las modalidades particulares proporcionan un sistema de administración para la administración de moléculas de ARNi para la inhibición postranscripcional de uno o más genes objetivo en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) de la planta y el control de una población de la plaga de la planta. En algunas modalidades, el sistema de administración comprende la ingestión de una célula vegetal transgénica huésped o el contenido de la célula huésped que comprende moléculas de ARN transcritas en la célula huésped. En estas y otras modalidades, se crea una célula vegetal transgénica o una planta transgénica que contiene un constructo de ADN recombinante que proporciona una molécula de ARNdh estabilizada de la invención. Las células vegetales transgénicas y las plantas transgénicas que comprenden ácidos nucleicos que codifican una molécula de ARNi particular pueden producirse mediante el empleo de tecnologías de ADN recombinante (cuyas tecnologías básicas son muy conocidas en la técnica) para construir un vector de transformación de plantas que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ARNi de la invención (por ejemplo, una molécula de ARNdh estabilizada); transformar una célula vegetal o una planta; y generar la célula vegetal transgénica o la planta transgénica que contiene la molécula de ARNi transcrita.

A los efectos de conferir una protección contra plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) a una planta transgénica, una molécula de ADN recombinante, por ejemplo, puede transcribirse a una molécula de ARNi, como, por ejemplo, una molécula de ARNdh, una molécula de ARNip, una molécula de miARN, una molécula de ARNhp, o una molécula de ARNhorq. En algunas modalidades, una molécula de ARN transcrita a partir de una molécula de ADN recombinante puede formar una molécula de ARNdh dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante. Dicha molécula de ARNdh puede estar comprendida en parte por un polinucleótido que es idéntico a un polinucleótido correspondiente transcrito a partir de un ADN dentro de una plaga de insectos de un tipo que puede infestar a la planta huésped. La expresión de un gen objetivo dentro de la plaga es suprimida por la molécula de ARNdh, y la supresión de la expresión del gen objetivo en la plaga resulta en la protección de la planta transgénica contra la plaga. Se demostró que los efectos moduladores de las moléculas de ARNdh son aplicables a una diversidad de genes expresados en plagas, que incluyen, por ejemplo, genes endógenos responsables del metabolismo celular o la transformación celular, que incluye genes constitutivos; factores de la transcripción; genes relacionados con la muda; y otros genes que codifican polipéptidos que participan en el metabolismo celular o en el crecimiento y desarrollo normales.

Para la transcripción de un transgen *in vivo* o un constructo de expresión, puede usarse una región reguladora (por ejemplo, promotor, potenciador, silenciador, y señal de poliadenilación) en algunas modalidades a fin de transcribir una o más hebras del ARN. Por lo tanto, en algunas modalidades, de acuerdo con lo establecido, *supra*, un polinucleótido para usar en la producción de moléculas de ARNi puede unirse operativamente a uno o más elementos promotores funcionales en una célula huésped vegetal. El promotor puede ser un promotor endógeno, generalmente residente en el genoma del huésped. El polinucleótido de la presente invención, bajo el control de un elemento promotor operativamente unido, puede estar además flanqueado por elementos adicionales que afectan ventajosamente su transcripción y/o la estabilidad de un transcrito resultante. Estos elementos pueden ubicarse corriente arriba del promotor operativamente unido, corriente abajo del extremo 3' del constructo de expresión, y pueden aparecer tanto corriente arriba del promotor como corriente abajo del extremo 3' del constructo de expresión.

Algunas modalidades proporcionan métodos para reducir el daño en una planta huésped (por ejemplo, una planta de maíz, canola, y soja) causado por una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) que se alimenta de la planta, en donde el método comprende proporcionar en la planta

huésped una célula vegetal transformada que expresa al menos una molécula de ácido nucleico de la invención, en donde dichas una o más moléculas de ácido nucleico funcionan al ser absorbidas por la plaga para inhibir la expresión de un polinucleótido objetivo dentro de la plaga, y la inhibición de la expresión resulta en la mortalidad y/o el crecimiento reducido de la plaga, por lo cual se reduce el
5 daño en la planta huésped causado por la plaga. En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico comprenden moléculas de ARNdh. En estas y otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico comprenden moléculas de ARNdh 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 la plaga de coleópteros y/o hemípteros. En algunas modalidades, las moléculas de ácido
10 nucleico constan de un polinucleótido específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de la plaga de insectos.

En otras modalidades, se proporciona un método para aumentar el rendimiento de un cultivo (por ejemplo, un cultivo de maíz), en donde el método comprende introducir en una planta al menos una molécula de ácido nucleico de la invención; cultivar la planta para permitir la expresión de una
15 molécula de ARNi que comprende el ácido nucleico, en donde la expresión de una molécula de ARNi que comprende al ácido nucleico inhibe el daño causado por una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) y/o el crecimiento de la plaga, por lo cual se reduce o elimina la pérdida del rendimiento debido a la infestación de la plaga. En algunas modalidades, la molécula de ARNi es una molécula de ARNdh. En estas y otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico comprenden
20 moléculas de ARNdh cada una de las cuales comprende más de un polinucleótido específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de la plaga de insectos. En algunos ejemplos, las moléculas de ácido nucleico comprenden un polinucleótido específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de una plaga de coleópteros y/o hemípteros.

25 En modalidades alternativas, se proporciona un método para modular la expresión de un gen objetivo en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), el método comprende: transformar una célula vegetal con un vector que comprende un polinucleótido que codifica al menos una molécula de ARNi de la invención, en donde el polinucleótido se halla operativamente unido a un promotor y a un elemento de terminación de la transcripción; cultivar la célula vegetal transformada
30 en condiciones suficientes como para permitir el desarrollo de un cultivo de células vegetales que incluye una pluralidad de células vegetales transformadas; seleccionar células vegetales transformadas

que tienen el polinucleótido integrado en sus genomas; cribar las células vegetales transformadas para detectar la expresión de una molécula de ARNi codificada por el polinucleótido integrado; seleccionar una célula vegetal transgénica que expresa la molécula de ARNi; y alimentar con la célula vegetal transgénica seleccionada a la plaga de insectos. Las plantas también pueden regenerarse a partir de células vegetales transformadas que expresan una molécula de ARNi codificada por la molécula de ácido nucleico integrada. En algunas modalidades, la molécula de ARNi es una molécula de ARNdh. En estas y otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico comprenden moléculas de ARNdh cada una de las cuales comprende más de un polinucleótido específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de la plaga de insectos. En algunos ejemplos, las moléculas de ácido nucleico comprenden un polinucleótido específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de una plaga de coleópteros y/o hemípteros.

Las moléculas de ARNi de la invención pueden incorporarse dentro de las semillas de una especie vegetal (por ejemplo, maíz, canola, y soja), ya sea en forma de un producto de expresión de un gen recombinante incorporado en un genoma de las células vegetales, o incorporado en un recubrimiento o tratamiento de semillas que se aplica a las semillas antes de la siembra. Una célula vegetal que comprende un gen recombinante se considera un evento transgénico. Se incluyen también en las modalidades de la invención sistemas de administración para administrar moléculas de ARNi a plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Por ejemplo, las moléculas de ARNi de la invención pueden introducirse directamente en las células de las plagas. Los métodos de tal introducción pueden incluir la mezcla directa del ARNi con tejido vegetal de un huésped para las plagas de insectos, así como también la aplicación de las composiciones que comprenden moléculas de ARNi de la invención a un tejido vegetal huésped. Por ejemplo, las moléculas de ARNi pueden atomizarse sobre una superficie vegetal. Alternativamente, una molécula de ARNi puede expresarse por un microorganismo, y el microorganismo puede aplicarse sobre la superficie vegetal o introducirse en una raíz o un tallo mediante un medio físico como, por ejemplo, una inyección. De acuerdo con lo expuesto en la presente, *supra*, una planta transgénica también puede diseñarse genéticamente para expresar al menos una molécula de ARNi en una cantidad suficiente para causar la muerte de las plagas de insectos conocidas como infestadoras de la planta. Las moléculas de ARNi producidas mediante síntesis química o enzimática también pueden formularse de manera coherente con las prácticas agrícolas comunes y pueden usarse como productos de atomización o cebo para controlar el daño ocasionado por una plaga de insectos en las plantas. Las formulaciones pueden

incluir los adherentes y humectantes adecuados requeridos para un cubrimiento foliar eficaz, así como también protectores contra UV para proteger las moléculas de ARNi (por ejemplo, moléculas de ARNdh) contra el daño causado por UV. Estos aditivos se usan generalmente en la industria de los bioinsecticidas, y son muy conocidos por los expertos en la técnica. Estas aplicaciones pueden combinarse con otras aplicaciones de insecticidas atomizables (utilizados biológicamente o de otro modo) para mejorar la protección de las plantas contra las plagas.

Todas las referencias, con inclusión de las publicaciones, patentes de invención y solicitudes de patentes de invención, citadas en la presente se incorporan a modo de referencia a la presente en el grado en que no sean inconsistentes con los detalles explícitos de esta descripción y se incorporan de este modo en el mismo grado tal como si cada referencia se indicara individual o específicamente como incorporada a modo de referencia y se estableciera en su totalidad en la presente. Las referencias explicadas en la presente se proporcionan solamente a los efectos de su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de la presente ha de interpretarse como una admisión de que los inventores no poseen el derecho de antedatar dicha descripción en virtud de una invención anterior.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a los efectos de ilustrar ciertas características y/o aspectos particulares. Estos ejemplos no deben interpretarse como taxativos de la descripción a las características o aspectos particulares descritos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Preparación de la muestra y bioensayos

Varias moléculas de ARNdh (que incluían aquellas correspondientes a la reg1 de *rplI215-1* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7), reg1 de *rplI215-2* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8), y reg1 de *rplI215-3* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9) se sintetizaron y purificaron con el uso del estuche de iARN MEGAscript® T7 (LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad, CA) o el estuche de síntesis de ARN T7 Quick High Yield ARN Synthesis Kit (NEW ENGLAND BIOLABS, Whitby, Ontario). Las moléculas de ARNdh purificadas se prepararon en el tampón TE y todos los bioensayos contenían un tratamiento de control que constaba de este tampón, que sirvió como testigo de fondo para determinar la mortalidad o inhibición del crecimiento de WCR (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Las concentraciones de

las moléculas de ARNdh en el tampón de bioensayo se midieron con el uso de un espectrómetro NANODROP™ 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Las muestras se sometieron a prueba para determinar la actividad de los insectos en bioensayos realizados con larvas de insectos neonatas con una dieta artificial para insectos. Los huevos de WCR se obtuvieron de Crop Characteristics, Inc. (Farmington, MN).

Los bioensayos se realizaron en bandejas de plástico de 128 pocillos diseñadas específicamente para bioensayos con insectos (C-D InteARNtional, Pitman, NJ). Cada pocillo contenía aproximadamente 1.0 mL de una dieta artificial diseñada para el crecimiento de insectos coleópteros. Se administró mediante una pipeta una fracción de 60 µL de muestra de ARNdh sobre la superficie de la dieta de cada pocillo (40 µL/cm²). Se calcularon las concentraciones de muestra de ARNdh como la cantidad de ARNdh por centímetro cuadrado (ng/cm²) de área superficial (1.5 cm²) en el pocillo. Las bandejas tratadas se mantuvieron en una campana extractora de gases hasta que el líquido en la superficie de la dieta se evaporó o absorbió en la dieta.

Dentro de unas pocas horas de la eclosión, se tomaron larvas individuales con un cepillo de pelo de camello humedecido y se depositaron sobre la dieta tratada (una o dos larvas por pocillo). Los pocillos infestados de las bandejas de plástico de 128 pocillos se sellaron luego con láminas adhesivas de plástico transparente y se ventilaron para permitir el intercambio de gases. Las bandejas del bioensayo se mantuvieron en condiciones ambientales controladas (28 °C, ~40 % de humedad relativa, 16:8 (Luz:Oscuridad)) durante 9 días, luego de lo cual se registraron la cantidad total de insectos expuestos a cada muestra, la cantidad de insectos muertos, y el peso de insectos sobrevivientes. El porcentaje de mortalidad promedio y la inhibición promedio de crecimiento se calcularon para cada tratamiento. La inhibición del crecimiento (IC) se calculó de la siguiente manera:

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

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

TNIT es la cantidad total de insectos en el tratamiento;

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

TNIBC es la cantidad total de insectos en el testigo de fondo (control de tampón).

El análisis estadístico se realizó con el uso del software JMP™ (SAS, Cary, NC).

La CL₅₀ (Concentración Letal) se define como la dosis a la que muere el 50 % de los insectos de prueba. La IC₅₀ (Inhibición del Crecimiento) se define como la dosis a la cual el crecimiento medio

(por ejemplo, peso vivo) de los insectos de prueba es el 50 % del valor medio observado en las muestras del testigo de fondo.

Los ensayos replicados demostraron que la ingestión de muestras particulares resultó, de manera sorprendente e inesperada, en una mortalidad y una inhibición del crecimiento de las larvas del gusano de la raíz del maíz.

Ejemplo 2: Identificación de genes objetivo candidatos

Los insectos de múltiples etapas del desarrollo de WCR (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) se seleccionaron para el análisis de transcriptomas agrupados a los efectos de proporcionar secuencias de genes objetivo candidatos para el control mediante la tecnología de protección contra insectos de plantas transgénicas con iARN.

En una ejemplificación, se aisló el ARN total de aproximadamente 0.9 g de larvas enteras de WCR de primer instar; (4 a 5 días luego de la eclosión; mantenidas a 16 °C), y se purificó con el uso del siguiente método basado en fenol/TRI REAGENT® (Molecular Research Center, Cincinnati, OH):

Las larvas se homogeneizaron a temperatura ambiente en un homogeneizador de 15 mL con 10 mL de TRI REAGENT® hasta que se obtuvo una suspensión homogénea. Luego de 5 min. de incubación a temperatura ambiente, el homogeneizado se colocó en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL (1 mL por tubo), se agregaron 200 µL de cloroformo y la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Luego de permitir que la extracción se asentara a temperatura ambiente durante 10 min, se separaron las fases mediante centrifugación a 12,000 x g a 4 °C. La fase superior (que comprendía aproximadamente 0.6 mL) se transfirió cuidadosamente a otro tubo estéril de 1.5 mL, y se agregó un volumen equivalente de isopropanol a temperatura ambiente. Luego de la incubación a temperatura ambiente durante 5 a 10 min, la mezcla se centrifugó 8 min a 12,000 x g (4 °C o 25 °C).

El sobrenadante se retiró cuidadosamente y se desechó, y el sedimento de ARN se lavó dos veces por vórtice con 75 % de etanol, con recuperación mediante centrifugación durante 5 min a 7,500 x g (4 °C o 25 °C) luego de cada lavado. Se procedió a retirar cuidadosamente el etanol, se dejó secar al aire el sedimento durante 3 a 5 min, para luego disolverlo en agua estéril libre de nucleasa. Se determinó la concentración de ARN mediante la medición de la absorbancia (A) a 260 nm y 280 nm. Una extracción típica de aproximadamente 0.9 g de larvas proporcionó más de 1 mg de ARN total, con una relación A_{260}/A_{280} de 1.9. El ARN extraído de este modo se almacenó a -80 °C hasta su procesamiento posterior.

La calidad del ARN se determinó haciendo pasar una fracción a través de gel de agarosa al 1 %. La solución de gel de agarosa se preparó con el uso de un tampón TAE 10x esterilizado en autoclave (Tris-acetato EDTA; a 1x de concentración es 0.04 M Tris-acetato, 1 mM EDTA (sal de sodio del ácido etilendiaminotetraacético), pH 8.0) diluido con agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato) en un recipiente esterilizado en autoclave. Se usó TAE 1x como tampón de corrida. Antes de usar, el tanque de electroforesis y el peine formador de pocillos se limpiaron con ARNseAway™ (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA). Se mezclaron dos µL de muestra de ARN con 8 µL de tampón TE (10 mM Tris HCl pH 7.0; 1 mM EDTA) y 10 µL de tampón de muestra de ARN (Novagen® núm. de Catálogo 70606; EMD4 Bioscience, Gibbstown, NJ). La muestra se calentó a 70 °C durante 3 min, se enfrió hasta la temperatura ambiente y se cargaron 5 µL (que contenían 1 µg a 2 µg de ARN) por pocillo. Los marcadores de peso molecular de ARN disponibles en el comercio se corrieron simultáneamente en pocillos separados para realizar una comparación del tamaño molecular. El gel se corrió a 60 voltios durante 2 h.

Una biblioteca de ADNc normalizada a partir del ARN total larvario fue preparada por un proveedor de servicios comerciales (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL), con el uso de un cebado aleatorio. La biblioteca de ADNc larvario normalizada se secuenció a 1/2 escala de lectura mediante la química serie GS FLX 454 Titanium™ en Eurofins MWG Operon, que resultó en más de 600,000 lecturas con una longitud promedio de lectura de 348 pb. Se ensamblaron 350,000 lecturas en más de 50,000 cóntigos. Tanto las lecturas no ensambladas como también los cóntigos se convirtieron en bases de datos compatibles con BLAST con el uso del programa públicamente disponible, FORMATDB (disponible de NCBI).

El ARN total y las bibliotecas de ADNc normalizadas se prepararon de manera similar a partir de materiales cosechados en otras etapas del desarrollo del WCR. Una biblioteca de transcriptomas agrupados para el cribaje del gen objetivo se construyó mediante la combinación de los miembros de la biblioteca de ADNc que representan las diversas etapas de desarrollo.

Se hipotetizó que los genes candidatos para el direccionamiento de la iARN son esenciales para la supervivencia y el crecimiento de los insectos de la plaga. Homólogos de genes objetivo seleccionados se identificaron en la base de datos de secuencias de transcriptomas, de acuerdo con lo descrito a continuación. Las secuencias de longitud completa o parcial de los genes objetivo se amplificaron por PCR para preparar plantillas para la producción de ARN de doble hebra (ARNdh).

Las búsquedas por TBLASTN con el uso de secuencias no codificantes de proteínas candidatas se realizaron contra bases de datos compatibles con BLAST que contienen las lecturas de secuencias de *Diabrotica* no ensambladas o los cóntigos ensamblados. Los aciertos significativos para una secuencia de *Diabrotica* (definidos como mejores que e^{-20} para las homologías de cóntigos y mejores que e^{-10} para las homologías de lecturas de secuencias no ensambladas) se confirmaron con el uso de BLASTX contra la base de datos no redundante del NCBI. Los resultados de esta búsqueda por BLASTX confirmaron que las secuencias de genes candidatos homólogos de *Diabrotica* identificadas en la búsqueda por TBLASTN comprendían verdaderamente genes de *Diabrotica*, o eran el mejor acierto para la secuencia de genes candidatos no pertenecientes a *Diabrotica* presentes en las secuencias de *Diabrotica*. En unos pocos casos, era claro que algunos de los cóntigos de *Diabrotica* o las lecturas de secuencias no ensambladas seleccionadas por homología respecto a un gen candidato que no pertenece a *Diabrotica* se superponían y que el ensamble de los cóntigos no había logrado estas superposiciones. En esos casos, se usó Sequencher™ v4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) para ensamblar las secuencias en cóntigos de mayor longitud.

Se identificaron varios genes objetivo candidatos que codificaban el *rpII215* de *Diabrotica* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3, y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5) como genes que pueden conducir a la mortalidad de las plagas de coleópteros, la inhibición del crecimiento, la inhibición del desarrollo y/o la inhibición de la alimentación en WCR.

El gen *ARN polimerasa II-215* de *Drosophila* (*rpII215*) codifica la subunidad principal de la ARN polimerasa II dependiente de ADN (Jokerst *et al.* (1989) Mol. Gen. Genet. 215(2):266-75), que cataliza la transcripción del ADN a ARN. En eucariotas, existen tres clases de ARN polimerasas (RNAP, *por sus siglas en inglés*): RNAP I, que transcribe el ARN ribosomal; RNAPII, que transcribe todos los genes codificantes de proteínas; y RNAPIII, que transcribe los genes del ARNr 5S y los ARNt. Estas estructuras complejas constan de 9 a 14 subunidades. Algunas de las subunidades son comunes entre las tres formas de polimerasas en todas las especies, mientras que otras son específicas de la especie y específicas de la clase. Se demostró que RNAPII se halla altamente conservada entre procariotas y eucariotas. Allison *et al.* (1985) Cell 42(2):599-610. En *Drosophila melanogaster*, RNAPII consta de al menos 12 subunidades electroforéticamente separables. La subunidad más grande (RpII215) codifica para una subunidad de 215 kDa.

Las secuencias SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3 y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5 son novedosas. Las secuencias no se proporcionan en las bases de datos públicas

y no se hallan descritas en la publicación de patente internacional PCT núm. WO/2011/025860; Solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20070124836; Solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20090306189; Solicitud de patente de los Estados Unidos núm. US20070050860; Solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20100192265; Patente de los Estados Unidos 7,612,194; o Solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2013192256. *rpII215-1* de WCR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1) se relaciona de alguna manera con un fragmento de una secuencia de *Ceratitis capitata* (núm. de acceso al GenBank: XM_004519999.1). *rpII215-2* de (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3) se relaciona de alguna manera con un fragmento de una secuencia de *Tribolium castaneum* (núm. de acceso al GenBank XM_008196951.1). *rpII215-3* de WCR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5) se relaciona de alguna manera con un fragmento de una secuencia de *Albugo laibachii* (núm. de acceso al GenBank FR824092.1). El homólogo más cercano de la secuencia de aminoácidos de RPII215-1 de WCR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2) es una proteína de *Drosophila simulans* que tiene el núm. de acceso al GenBank ABB29549.1 (95 % similar; 92 % idéntica con respecto a la región de homología). El homólogo más cercano de la secuencia de aminoácidos de RPII215-2 de WCR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4) es una proteína de *Tribolium castaneum* que tiene el núm. de acceso al GenBank XP_008195173.1 (97 % similar; 96 % idéntica respecto a la región de homología). El homólogo más cercano de la secuencia de aminoácidos de RPII215-3 de WCR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6) es una proteína de *Phytophthora sojae* que tiene el núm. de acceso al GenBank EGZ16741.1 (96 % similar; 93 % idéntica respecto a la región de homología).

Los transgenes de ARNdh de *RpII215* pueden combinarse con otras moléculas de ARNdh para proporcionar efectos de iARN sinérgicos y direccionamiento de la iARN redundante. Los eventos de maíz transgénico que expresan ARNdh dirigido a *rpII215* son útiles para evitar el daño causado por el gusano de la raíz del maíz que se alimenta de las raíces. Los transgenes de ARNdh de *RpII215* representan nuevos modos de acción para combinar la tecnología de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* en pirámides génicas para el control de la resistencia de los insectos a fin de mitigar contra el desarrollo de las poblaciones de gusanos de la raíz resistentes a cualquiera de estas tecnologías de control del gusano de la raíz.

Ejemplo 3: Amplificación de genes objetivo para producir ARNdh

Se usaron clones de longitud completa o parcial de secuencias de un gen candidato de *Diabrotica*, mencionado en la presente como *rpII215*, para generar amplicones de PCR para la síntesis de ARNdh. Se diseñaron cebadores para amplificar porciones de las regiones codificantes de cada gen objetivo

por PCR. Véase la Tabla 1. Cuando era adecuado, se incorporó una secuencia promotora de fago T7 (TTAATACGACTCACTATAGGGAGA; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10) en los extremos 5' de las hebras sentido o antisentido amplificadas. Véase la Tabla 1. Se extrajo todo el ARN total del WCR con el uso de TRIzol[®] (Life Technologies, Grand Island, NY), y luego se usó para preparar el ADNc de primera hebra con el sistema de síntesis de primera hebra SuperScriptIII[®] y las instrucciones de los fabricantes de cebadores Oligo dT (Life Technologies, Grand Island, NY). Se usó un ADNc de primera hebra como plantilla para las reacciones de PCR con el uso de cebadores opuestos situados para amplificar la totalidad o parte de la secuencia génica objetivo nativa. Se amplificó también el ARNdh a partir de un clon de ADN que comprendía la región codificante para una proteína fluorescente amarilla (YFP, *por sus siglas en inglés*) (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:11; Shagin *et al.* (2004) Mol. Biol. Evol. 21(5):841-50).

Tabla 1. Cebadores y pares de cebadores usados para amplificar porciones de regiones codificantes del gen objetivo *rpII-215* ejemplar y el gen *YFP* de control negativo.

	Id. del gen	Id. del cebador	Secuencia
Par 1	<i>rpII215-1</i>	Dvv-rpII215-1_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGCTT ATGGACGCTGCATC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:12)
		Dvv-rpII215-1_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGCTC TGTATTTTCGATGCCATAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:13)
Par 2	<i>rpII215-2</i>	Dvv-rpII215-2_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACCCA ATGAGAGGAGTATCTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:14)
		Dvv-rpII215-2_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGGTA TGGCAATTCCCATTTTAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:15)

5	Par 3	<i>rpII215-3</i>	Dvv-rpII215-3_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACCCA TTGACTGGTGTGTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:16)
			Dvv-rpII215-3_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTCGAT GGCGTTTGCCAATTTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:17)
10	Par 4	<i>rpII215-2</i> <i>v1</i>	Dvv-rpII215- 2_v1_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACCCA ATGAGAGGAGTATCTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:18)
			Dvv-rpII215- 2_v1_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGGTA TGGCAATTCCCATTTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:19)
15	Par 5	YFP	YFP-F_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAcaccatgggc tccagcggcgccc (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:27)
			YFP-R_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAagatcttgaa ggcgctcttcagg (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:30)

Ejemplo 4: Constructos de iARN

Preparación de plantillas mediante PCR y síntesis del ARNdh.

Se muestra en la Figura 1 una estrategia usada para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNdh de *rpII215* y *YFP*. Los ADN plantilla previstos para usar en la síntesis del ARNdh de *rpII215* se prepararon por PCR con el uso de los pares de cebadores indicados en la Tabla 1 y (como plantilla de PCR) el ADNc de primera hebra preparado a partir del ARN total aislado de huevos de WCR, larvas de primer instar, o adultos. Para cada región de los genes objetivo *rpII215* y *YFP* seleccionada, las amplificaciones por PCR introdujeron una secuencia promotora T7 en los extremos 5' de las hebras sentido y antisentido amplificadas (el segmento de *YFP* se amplificó a partir de un clon de ADN de la región codificante de *YFP*). Los dos fragmentos amplificados por PCR para cada región de los genes objetivo se mezclaron luego en cantidades aproximadamente iguales, y la mezcla se usó como plantilla de transcripción para la producción de ARNdh. Véase la Figura 1. Las secuencias de las plantillas de ARNdh amplificadas con los pares de cebadores particulares fueron: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7 (reg1 de *rpII215-1*), SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8 (reg1 de

rpII215-2), SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9 (reg1 de *rpII215-3*), y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:11 (YFP). El ARN de doble hebra para el bioensayo de insectos se sintetizó y purificó con el uso de un estuche de iARN Ambion® MEGAscript® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen) o el estuche de transcripción in vitro de T7 HiScribe® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA). Las concentraciones de los ARNdh se midieron con un espectrofotómetro NanoDrop™ 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Construcción de vectores de transformación de plantas.

Los vectores de entrada que alojan un constructo del gen objetivo para la formación de la horquilla que comprende segmentos de *rpII215* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79, y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81) se ensamblan con el uso de una combinación de fragmentos sintetizados químicamente (DNA2.0, Menlo Park, CA) y métodos de clonación molecular estándar. La formación de horquilla intramolecular en los transcritos primarios de ARN se facilita con la disposición (dentro de una única unidad de transcripción) de dos copias del segmento del gen objetivo *rpII215* en orientación opuesta respecto una de la otra, donde los dos segmentos se hallan separados por un polinucleótido enlazante (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:126, y un intrón ST-LS1 (Vancanneyt *et al.* (1990) Mol. Gen. Genet. 220(2):245-50)). De este modo, el transcrito primario de ARNm contiene las dos secuencias de segmentos del gen *rpII215* como repeticiones invertidas grandes respecto una de la otra, separadas por la secuencia de intrones. Una copia de un promotor (por ejemplo, ubiquitina 1 de maíz, Patente de los Estados Unidos núm. 5,510,474; 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV); promotor de badnavirus baciliforme de la caña de azúcar (ScBV); promotores de genes de actina del arroz; promotores de ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 del maíz; promotor de ALS; promotor del gen de faseolina; *cab*; *rubisco*; *LAT52*; *Zm13*; y/o *apg*) se usa para conducir la producción del transcrito primario de ARNm de horquilla y un fragmento que comprende una región no traducida 3' (por ejemplo, un gen de peroxidasa 5 de maíz (ZmPer5 3'UTR v2; Patente de los Estados Unidos núm. 6,699,984), AtUbi10, AtEfl, o StPinII) se usa para terminar la transcripción del gen que expresa el ARN de horquilla.

El vector de entrada pDAB126157 comprende un constructo de ARN v1 de *rpII215* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:124) que comprende un segmento de *rpII215* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8).

Los vectores de entrada descritos anteriormente se usan en reacciones de recombinación estándar GATEWAY® con un vector de destino binario típico para producir vectores de transformación para la

expresión de ARN de horquilla de *rpII215* para transformaciones de embriones de maíz mediadas por *Agrobacterium*.

El vector de destino binario comprende un gen de tolerancia a herbicidas (ariloxialcanoato dioxigenasa; AAD-1 v3) (Patente de los Estados Unidos 7,838,733(B2), y Wright *et al.* (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:20240-5) bajo la regulación de un promotor vegetal operable (por ejemplo, el promotor de badnavirus baciliforme de la caña de azúcar (ScBV) (Schenk *et al.* (1999) Plant Mol. Biol. 39:1221-30) y ZmUbi1 (Patente de los Estados Unidos 5,510,474)). Se sitúan una 5'UTR y un intrón entre el extremo 3' del segmento promotor y el codón de inicio de la región codificante de *AAD-I*. Un fragmento que comprende una región no traducida 3' de un gen de lipasa de maíz (ZmLip 3'UTR; Patente de los Estados Unidos 7,179,902) se usa para terminar la transcripción del ARNm de *AAD-I*.

Un vector binario de control negativo, que comprende un gen que expresa una proteína YFP, se construye por medio de reacciones de recombinación estándar GATEWAY[®] con un vector de destino binario típico y un vector de entrada. El vector de destino binario comprende un gen de tolerancia a herbicidas (ariloxialcanoato dioxigenasa; AAD-1 v3) (como se indicó anteriormente) bajo la regulación de la expresión de un promotor de ubiquitina 1 de maíz (como se indicó anteriormente) y un fragmento que comprende una región no traducida 3' de un gen de lipasa de maíz (ZmLip 3'UTR; como se indicó anteriormente). El vector de entrada comprende una región codificante de YFP (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:20) bajo el control de la expresión de un promotor de ubiquitina 1 de maíz (como se explicó anteriormente) y un fragmento que comprende una región no traducida 3' de un gen de peroxidasa 5 de maíz (como se indicó anteriormente).

Ejemplo 5: Cribaje de genes objetivo candidatos

El ARNdh sintético diseñado para inhibir secuencias de genes objetivo identificadas en el EJEMPLO 2 causó la mortalidad y la inhibición del crecimiento cuando se administró a WCR en ensayos basados en la dieta.

Los bioensayos replicados demostraron que la ingestión de las preparaciones de ARNdh derivadas de la reg1 de *rpII215-2* resultaron en la mortalidad y la inhibición del crecimiento de las larvas del gusano de la raíz del maíz occidental. La Tabla 2 y la Tabla 3 muestran los resultados de los bioensayos de alimentación basados en la dieta de larvas de WCR luego de 9 días de exposición a ARNdh de reg1 de *rpII215-2*, así como también los resultados obtenidos con una muestra de control

negativo de ARNdh preparado a partir de una región codificante de la proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:11).

Tabla 2. Resultados de los ensayos de alimentación de dieta de ARNdh de *rpII215* obtenidos con larvas del gusano de la raíz del maíz occidental luego de 9 días de alimentación. El análisis ANOVA halló diferencias significativas en la media del % de mortalidad y la media del % de inhibición del crecimiento (IC). Las medias se separaron con el uso de la prueba de Tukey-Kramer.

Nombre del gen	Dosis (ng/cm ²)	N	Media (% de mortalidad) ± SEM*	mEDIA (Ic) ± SEM
Reg1 de <i>rpII215-2</i>	500	20	79.14±5.20 (A)	0.85±0.07 (A)
TE**	0	14	13.60±1.71 (B)	0.06±0.05 (B)
Agua	0	14	14.94±2.39 (B)	-0.15±0.06 (B)
YFP***	500	14	18.99±4.74 (B)	0.09±0.08 (B)

*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).

**TE = Tampón de Tris HCl (1 mM) más EDTA (0.1 mM), pH 7.2.

***YFP = Proteína fluorescente amarilla

Tabla 3. Resumen de la potencia por vía oral del ARNdh de *rpII215* en larvas de WCR (ng/cm²).

Nombre del gen	CL ₅₀	Rango	IC ₅₀	Rango
Reg1 de <i>rpII215-2</i>	57.84	45.36 - 74.71	30.19	19.17 - 47.55

Se sugirió anteriormente que ciertos genes de *Diabrotica* spp. pueden explotarse para el control de insectos mediado por la iARN. Véanse la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 2007/0124836, que describe 906 secuencias, y la patente de los Estados Unidos núm. 7,612,194, que describe 9,112 secuencias. Sin embargo, se determinó que muchos genes de los que se sugería que tienen utilidad para el control de insectos mediado por la iARN no son eficaces para controlar el género *Diabrotica*. Se determinó también que la secuencia de reg1 de *rpII215-2* proporciona un control superior sorprendente e inesperado de *Diabrotica* en comparación con otros genes de los que se sugería que tenían utilidad para el control de insectos mediado por la iARN.

Por ejemplo, se sugirió en la patente de los Estados Unidos 7,612,194 que los genes *anexina*, *beta espectralina 2*, y *mtRP-L4* son eficaces en el control de insectos mediado por la iARN. La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:21 es la secuencia de ADN de la región 1 de *anexina* (Reg 1) y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:22 es la secuencia de ADN de la región 2 de *anexina* (Reg 2). La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:23 es la secuencia de ADN de la región 1 de *beta espectralina 2* (Reg 1) y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:24 es la secuencia de ADN de la región 2 de *beta espectralina 2* (Reg2). La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:25 es la secuencia de ADN de la región 1 de *mtRP-L4* (Reg 1) y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:26 es la secuencia de ADN de la región 2 de *mtRP-L4* (Reg 2). Se usó también una secuencia de YFP (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:11) para producir ARNdh como control negativo.

Cada una de las secuencias mencionadas anteriormente se usó para producir ARNdh mediante los métodos del EJEMPLO 3. La estrategia usada para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNdh se muestra en la Figura 2. Los ADN plantilla previstos para usar en la síntesis de ARNdh se prepararon mediante PCR con el uso de los pares de cebadores indicados en la Tabla 4 y (como plantilla de PCR) el ADNc de primera hebra preparado a partir del ARN total aislado de larvas de WCR de primer instar. (La YFP se amplificó a partir de un clon de ADN). Para cada región de genes objetivo seleccionada, se realizaron dos amplificaciones por PCR separadas. La primera amplificación por PCR introdujo una secuencia promotora T7 en el extremo 5' de las hebras sentido amplificadas. La segunda reacción incorporó la secuencia promotora T7 en los extremos 5' de las hebras antisentido. Los dos fragmentos amplificados por PCR para cada región de los genes objetivo se mezclaron luego en cantidades aproximadamente iguales, y la mezcla se usó como plantilla de transcripción para la producción de ARNdh. Véase la Figura 2. El ARN de doble hebra se sintetizó y purificó con el uso de un estuche de iARN Ambion® MEGAscript® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Las concentraciones de los ARNdh se midieron con un espectrofotómetro NanoDrop™ 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y los ARNdh se sometieron a prueba cada uno mediante los mismos métodos de bioensayo basados en la dieta que se describieron anteriormente. La Tabla 4 menciona las secuencias de los cebadores usados para producir la Reg1 de *anexina*, Reg2 de *anexina*, Reg1 de *beta espectralina 2*, Reg2 de *beta espectralina 2*, Reg1 de *mtRP-L4*, Reg2 de *mtRP-L4*, y moléculas de ARNdh de YFP. La Tabla 5 presenta los resultados de los bioensayos de alimentación basados en la dieta de larvas de WCR luego de 9 días de exposición a estas moléculas de ARNdh. Los bioensayos replicados demostraron que la ingestión de estos ARNdh

resultó en ninguna mortalidad o inhibición del crecimiento en las larvas del gusano de la raíz del maíz occidental superior a la observada con las muestras de control de tampón TE, agua, o proteína YFP.

Tabla 4. Cebadores y pares de cebadores usados para amplificar porciones de regiones codificantes de genes

5		Gen (Región)	Id. del cebador	Secuencia
	Par 6	YFP	YFP-F_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACACCATGG GCTCCAGCGGCGCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:27)
10		YFP	YFP-R	AGATCTTGAAGGCGCTCTTCAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:28)
	Par 7	YFP	YFP-F	CACCATGGGCTCCAGCGGCGCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:29)
15		YFP	YFP-R_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGATCTTG AAGGCGCTCTTCAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:30)
	Par 8	<i>Anexina</i> (Reg 1)	Ann-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTCCAAC AGTGGTTCCTTATC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:31)
20		<i>Anexina</i> (Reg 1)	Ann-R1	CTAATAATTCTTTTTTAATGTTTCCTGAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:32)
	Par 9	<i>Anexina</i> (Reg 1)	Ann-F1	GCTCCAACAGTGGTTCCTTATC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:33)
25		<i>Anexina</i> (Reg 1)	Ann-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTAATAAT TCTTTTTTAATGTTTCCTGAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:34)
	Par 10	<i>Anexina</i> (Reg 2)	Ann-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGATTGTTACA AGCTGGAGAACTTCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:35)
30		<i>Anexina</i> (Reg 2)	Ann-R2	CTTAACCAACAACGGCTAATAAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:36)

5	Par 11	<i>Anexina</i> (Reg 2)	Ann-F2	TTGTTACAAGCTGGAGAACTTCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:37)
		<i>Anexina</i> (Reg 2)	Ann-R2T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTTAACCA ACAACGGCTAATAAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:38)
10	Par 12	<i>Beta-spect2</i> (Reg 1)	Betasp2-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGATGTTG GCTGCATCTAGAGAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:39)
		<i>Beta-spect2</i> (Reg 1)	Betasp2-R1	GTCCATTCGTCCATCCACTGCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:40)
15	Par 13	<i>Beta-spect2</i> (Reg 1)	Betasp2-F1	AGATGTTGGCTGCATCTAGAGAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:41)
		<i>Beta-spect2</i> (Reg 1)	Betasp2-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAGTCCATTC GTCCATCCACTGCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:42)
20	Par 14	<i>Beta-spect2</i> (Reg 2)	Betasp2-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAGCAGATG AACACCAGCGAGAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:43)
		<i>Beta-spect2</i> (Reg 2)	Betasp2-R2	CTGGGCAGCTTCTTGTTTCCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:44)
25	Par 15	<i>Beta-spect2</i> (Reg 2)	Betasp2-F2	GCAGATGAACACCAGCGAGAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:45)
		<i>Beta-spect2</i> (Reg 2)	Betasp2-R2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTGGGCAG CTTCTTGTTTCCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:46)
30	Par 16	<i>mtRP-L4</i> (Reg 1)	L4-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGTGAAAT GTTAGCAAATATAACATCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:47)
		<i>mtRP-L4</i> (Reg 1)	L4-R1	ACCTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:48)

5	Par 17	<i>mtRP-L4</i> (Reg 1)	L4-F1	AGTGAAATGTTAGCAAATATAACATCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:49)
		<i>mtRP-L4</i> (Reg 1)	L4-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAACCTCTCA CTTCAAATCTTGACTTTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:50)
10	Par 18	<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAGTCA AGATTTGAAGTGAGAGGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:51)
		<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-R2	CTACAAATAAAACAAGAAGGACCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:52)
15	Par 19	<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-F2	CAAAGTCAAGATTTGAAGTGAGAGGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:53)
		<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-R2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTACAAAT AAAACAAGAAGGACCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:54)

Tabla 5. Resultados de los ensayos de alimentación de dieta obtenidos con larvas del gusano de la raíz del maíz occidental luego de 9 días.

20	Nombre del gen	Dosis (ng/cm ²)	Peso medio de larvas vivas (mg)	Media del % de mortalidad	Media de inhibición del crecimiento
	<i>anexina</i> -Reg 1	1,000	0.545	0	-0.262
	<i>anexina</i> -Reg 2	1,000	0.565	0	-0.301
	<i>beta spectrina2</i> Reg 1	1,000	0.340	12	-0.014
25	<i>beta spectrina2</i> Reg 2	1,000	0.465	18	-0.367
	<i>mtRP-L4</i> Reg 1	1,000	0.305	4	-0.168
	<i>mtRP-L4</i> Reg 2	1,000	0.305	7	-0.180
	Tampón TE*	0	0.430	13	0.000
	Agua	0	0.535	12	0.000
30	YFP**	1,000	0.480	9	-0.386

*TE = Tampón de Tris HCl (10 mM) más EDTA (1 mM), pH 8.

**YFP = Proteína fluorescente amarilla

Ejemplo 6: Producción de tejidos de maíz transgénico que comprenden ARNdh insecticidas

Transformación mediada por *Agrobacterium*

- 5 Las células, tejidos, y plantas de maíz transgénico que producen una o más moléculas de ARNdh insecticidas (por ejemplo, al menos una molécula de ARNdh que incluye una molécula de ARNdh dirigida a un gen que comprende *rpII215* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3 y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5)) a través de la expresión de un gen quimérico integrado establemente en el genoma de la planta se producen mediante una transformación
10 mediada por *Agrobacterium*. Los métodos de transformación del maíz que emplean vectores de transformación superbinarios o binarios son conocidos en la técnica, de acuerdo con lo descrito, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos 8,304,604, que se incorpora a la presente en su totalidad a modo de referencia. Los tejidos transformados se seleccionan por su capacidad de crecer en un medio que contiene Haloxifop y se criban para la producción de ARNdh, según corresponda. Las
15 porciones de los cultivos de tejido transformado pueden presentarse a larvas neonatas de gusano de la raíz del maíz para el bioensayo, esencialmente como se describe en el Ejemplo 1.

Inicio del cultivo de *Agrobacterium*. Reservas en glicerol de células de la cepa de *Agrobacterium* DAt13192 (Publicación internacional PCT núm. WO 2012/016222A2) que alojan un vector de transformación binario descrito anteriormente (EJEMPLO 4) se siembran por estrías en placas de
20 medio mínimo AB (Watson, *et al.* (1975) J. Bacteriol. 123:255-264) que contienen antibióticos adecuados, y se dejan crecer a 20 °C durante 3 días. Después, los cultivos se siembran por estrías sobre placas de YEP (g/L: extracto de levadura, 10; Peptona, 10; NaCl, 5) que contienen los mismos antibióticos y se incuban a 20 °C durante 1 día.

Cultivo de *Agrobacterium*. El día del experimento, una solución de reserva del medio de inoculación y acetosiringona se prepara en un volumen adecuado para la cantidad de constructos del experimento
25 y se colocan con pipetas en un matraz de 250 mL estéril y desechable. El medio de inoculación (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 and Business Media, LLC. páginas 327-341)) contiene: 2.2 g/L de sales de MS; 1X de vitaminas de MS modificadas por ISU (Frame *et al.*, *ibid.*) 68.4 g/L de sacarosa; 36 g/L de glucosa; 115 mg/L de L-prolina; y 100 mg/L de mioinositol; a pH 5.4). Se agrega acetosiringona al
30

matraz que contiene el medio de inoculación hasta una concentración final de 200 μ M a partir de una solución de reserva 1 M en 100 % de sulfóxido de dimetilo, y la solución se mezcla completamente.

Para cada constructo, se suspenden 1 o 2 asas de inoculación llenas de *Agrobacterium* de la placa de YEP en 15 mL de la solución de reserva de medio de inoculación/acetosiringona en un tubo de centrífuga de 50 mL estéril y desechable, y se mide la densidad óptica de la solución a 550 nm (DO₅₅₀) en un espectrofotómetro. La suspensión se diluye luego hasta una DO₅₅₀ de 0.3 a 0.4 con el uso de mezclas adicionales de medio de inoculación/acetosiringona. El tubo de suspensión de *Agrobacterium* se coloca luego horizontalmente en una zaranda de plataforma establecida a aproximadamente 75 rpm a temperatura ambiente y se agita durante 1 a 4 horas mientras se realiza la disección de los embriones.

Esterilización de espigas y aislamiento de embriones. Se obtienen embriones inmaduros de maíz a partir de plantas de la línea endogámica B104 de *Zea mays* (Hallauer *et al.* (1997) Crop Science 37:1405-1406), cultivadas en el invernadero y autopolinizadas o polinizadas entre hermanas para producir espigas. Las espigas se cosechan aproximadamente a los 10 a 12 días luego de la polinización. En el día experimental, las espigas sin chala se esterilizan en la superficie por inmersión en una solución de lejía comercial al 20 % (lejía germicida Ultra Clorox®, 6.15 % de hipoclorito de sodio; con dos gotas de TWEEN 20) y se agita durante 20 a 30 min, seguido por tres enjuagues en agua estéril desionizada en una campana de flujo laminar. Los embriones cigotos inmaduros (1.8 a 2.2 mm de largo) se diseccionan asépticamente de cada espiga y se distribuyen aleatoriamente en tubos de microcentrífuga que contienen 2.0 mL de una suspensión de células de *Agrobacterium* adecuadas en medio de inoculación líquido con 200 μ M de acetosiringona, en el que se agregan 2 μ L de tensioactivo 10 % BREAK-THRU® S233 (Evonik Industries; Essen, Alemania). Para un conjunto dado de experimentos, los embriones de las espigas agrupadas se usan para cada transformación.

Cocultivo de *Agrobacterium*

Luego del aislamiento, los embriones se colocan en una plataforma oscilante durante 5 minutos. El contenido del tubo se vierte luego sobre una placa de medio de cocultivo, que contiene 4.33 g/L de sales de MS; 1X de vitaminas de MS modificadas por ISU; 30 g/L de sacarosa; 700 mg/L de L-prolina; 3.3 mg/L de Dicamba en KOH (ácido 3,6-dicloro-o-anísico o ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico); 100 mg/L de mioinositol; 100 mg/L de hidrolizado enzimático de caseína; 15 mg/L de AgNO₃; 200 μ M de acetosiringona en DMSO; y 3 g/L de GELZAN™, a pH 5.8. La suspensión líquida de *Agrobacterium* se retira con una pipeta de transferencia estéril y desechable. Los embriones

se orientan luego con el escutelo hacia arriba con pinzas estériles con la ayuda de un microscopio. Se cierra la placa, se sella con una cinta médica 3M™ MICROPORE™, y se coloca en una incubadora a 25 °C con luz continua a aproximadamente 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa (PAR, *por sus siglas en inglés*).

- 5 Selección de callos y regeneración de eventos transgénicos. Luego del período de cocultivo, los embriones se transfieren a un medio de reposo, compuesto por 4.33 g/L de sales de MS; 1X de vitaminas de MS modificadas por ISU; 30 g/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 g/L de MES (monohidrato de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; 10 PhytoTechnologies Labr.; Lenexa, KS); 250 mg/L de carbenicilina; y 2.3 g/L de Gelzan™; a pH 5.8. Se trasladan a cada placa no más de 36 embriones. Las placas se colocan en una caja de plástico transparente y se incuban a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR durante 7 a 10 días. Los embriones con callos se transfieren luego (<18/placa) a medio de selección I, que consiste en el medio de reposo (indicado anteriormente) con 100 nM de ácido R-Haloxifop 15 (0.0362 mg/L; para la selección de los callos que alojan el gen *AAD-1*). Las placas se regresan a las cajas transparentes y se incuban a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR durante 7 días. Los embriones con callos se transfieren luego (<12/placa) a medio de selección II, que consiste en el medio de reposo (indicado anteriormente) con 500 nM de ácido R-Haloxifop (0.181 mg/L). Las placas se regresan a las cajas transparentes y se incuban a 27 °C con luz continua a 20 aproximadamente 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR durante 14 días. Este paso de selección permite que los callos transgénicos proliferen más aún y se diferencien.

- Los callos embriogénicos proliferantes se transfieren (<9/placa) a medio de prerregeneración. El medio de prerregeneración contiene 4.33 g/L de sales de MS; 1X de vitaminas de MS modificadas por ISU; 45 g/L de sacarosa; 350 mg/L de L-prolina; 100 mg/L de mioinositol; 50 mg/L de hidrolizado 25 enzimático de caseína; 1.0 mg/L de AgNO_3 ; 0.25 g/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 g/L de Gelzan™; y 0.181 mg/L de ácido Haloxifop; a pH 5.8. Las placas se almacenan en cajas transparentes y se incuban a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR durante 7 días. Los callos en regeneración se transfieren luego (<6/placa) al medio de 30 regeneración en Phytatrays™ (sigma-aldrich) y se incuban a 28 °C con 16 horas de luz/8 horas de oscuridad por día (a aproximadamente 160 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR) durante 14 días o hasta que se

desarrollan los brotes y las raíces. El medio de regeneración contiene 4.33 g/L de sales de MS; 1X de vitaminas de MS modificadas por ISU; 60 g/L de sacarosa; 100 mg/L de mioinositol; 125 mg/L de carbenicilina; 3 g/L de goma Gellan™; y 0.181 mg/L de ácido R-Haloxifop; a pH 5.8. Los brotes pequeños con raíces primarias luego se aíslan y transfieren a un medio de elongación sin selección. El medio de elongación contiene 4.33 g/L de sales de MS; 1X de vitaminas de MS modificadas por ISU; 30 g/L de sacarosa; y 3.5 g/L de Gelrite™: a pH 5.8.

Los brotes de plantas transformadas seleccionados por su capacidad para crecer en un medio que contiene haloxifop se trasplantan desde Phytatrays™ a macetas pequeñas rellenas con medio de crecimiento (ProMix BX; Premier Tech Horticulture), cubiertas con cúpulas o HUMI-DOMES (ARCO PLASTICS), y luego se aclimatan en una cámara de cultivo Conviron (27 °C día/24 °C noche, fotoperíodo de 16 horas, 50-70 % de HR, 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR). En algunos casos, se analizan las plántulas transgénicas putativas para determinar la cantidad de copias relativas de transgenes mediante ensayos de PCR en tiempo real cuantitativos con el uso de cebadores diseñados para detectar el gen *AAD1* de tolerancia a herbicidas integrado en el genoma del maíz. Además, se usan ensayos de RT-qPCR para detectar la presencia de la secuencia enlazante y/o de secuencia objetivo en transformantes putativos. Las plántulas transformadas seleccionadas se trasladan luego a un invernadero para un mayor crecimiento y la realización de pruebas.

Transferencia y establecimiento de plantas T₀ en el invernadero para bioensayo y producción de semillas. Cuando las plantas alcanzan la etapa V3-V4, se trasplantan a una mezcla de suelo IE Custom Blend (PROFILE/METRO MIX 160) y se dejan crecer hasta la floración en el invernadero (tipo de exposición a la luz: Foto o Asimilación; Límite alto de luz: 1,200 PAR; día de 16 horas de duración; 27 °C día/24 °C noche).

Las plantas que se usarán para los bioensayos de insectos se trasplantan desde las macetas pequeñas a Tinus™ 350-4 Roottrainers® (Spencer-Lemaire Industries, Acheson, Alberta, Canadá;) (una planta por evento por Roottrainer®). Luego de aproximadamente 4 días del trasplante a Roottrainers®, se procede a infestar las plantas para el bioensayo.

Las plantas de la generación T₁ se obtienen mediante la polinización de los estigmas de las plantas transgénicas T₀ con polen recogido de plantas de la línea endogámica no transgénica B104 u otros donantes de polen adecuados, y la siembra de las semillas resultantes. Se realizan cruzamientos recíprocos cuando es posible.

Ejemplo 7: Análisis moleculares de tejidos de maíz transgénico

Los análisis moleculares (por ejemplo, RT-qPCR) de tejidos de maíz se realizan en muestras de hojas recogidas de plantas cultivadas en invernadero el día antes o el mismo día en el que se evalúa el daño por alimentación de raíces.

Los resultados de los ensayos RT-qPCR para el gen objetivo se usan para validar la expresión del transgen. Los resultados de los ensayos de RT-qPCR para la secuencia intermedia entre las secuencias de repetición (que es integral a la formación de moléculas de ARNdh de horquilla) en ARN expresados se usan alternativamente para validar la presencia de transcritos de horquilla. Los niveles de expresión del ARN del transgen se miden con respecto a los niveles de ARN de un gen de maíz endógeno.

Los análisis del ADN por qPCR para detectar una porción de la región codificante de *AADI* en ADN_g se usan para estimar la cantidad de copias de inserción del transgen. Las muestras para estos análisis se recogen de plantas cultivadas en cámaras ambientales. Los resultados se comparan con los resultados de la qPCR de ADN de los ensayos diseñados para detectar una porción de un gen nativo de una única copia, y se adelantan eventos simples (que tienen una o dos copias de transgenes *rpII215*) para otros estudios en el invernadero.

Adicionalmente, los ensayos de qPCR diseñados para detectar una porción del gen de resistencia a la espectinomicina (*SpecR*; alojado en los plásmidos vectores binarios fuera del T-ADN) se usan para determinar si las plantas transgénicas contienen secuencias de estructura principal de plásmidos integradas extrañas.

Nivel de expresión del transcrito de ARN: qPCR del objetivo. Las plantas transgénicas se analizan mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de la secuencia objetivo para determinar el nivel de expresión relativo del transgen, en comparación con el nivel del transcrito de un gen de maíz interno (por ejemplo, núm. de acceso al GenBank BT069734), que codifica una proteína tipo TIP41 (es decir, un homólogo de maíz con núm. de acceso al GenBank AT4G34270; que tiene un puntaje en tBLASTX de 74 % de identidad). El ARN se aísla con el uso del estuche de aislamiento de ARN total Norgen BioTek™ (Norgen, Thorold, ON). El ARN total se somete a un tratamiento de DNase1 en columna On-Column™ de acuerdo con el protocolo sugerido en el estuche. El ARN se cuantifica luego en un espectrofotómetro NanoDROP 8000 (Thermo Scientific) y la concentración se normaliza a 50 ng/μL. El ADNc de primera hebra se prepara con el uso de un estuche de síntesis de ADNc de alta capacidad (INVITROGEN) en un volumen de reacción de 10 μL con 5 μL de ARN desnaturalizado, sustancialmente de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. El

protocolo se modifica levemente para incluir la adición de 10 µL de 100 µM de oligonucleótido T20VN (IDT) (TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN, donde V es A, C, o G, y N es A, C, G, o T; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:56) en el tubo de 1 mL de mezcla de reserva de cebador aleatorio, a fin de preparar una reserva de trabajo de los cebadores aleatorios y el oligo dT combinados.

- 5 Luego de la síntesis de ADNc, las muestras se diluyen 1:3 con agua libre de nucleasa, y se almacenan a -20 °C hasta el ensayo.

Se realizan ensayos de PCR en tiempo real separados para el gen objetivo y el transcrito tipo TIP41 en un LightCycler™ 480 (Roche diagnostics, Indianápolis, IN) en volúmenes de reacción de 10 µL. Para el ensayo de genes objetivo, se realizan las reacciones con el conjunto 1 de cebadores de rpII215 FWD (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:57) y el conjunto 1 de rpII215 REV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:58) y el conjunto PRB 1 de sondas oligo personalizadas IDT para rpII215, etiquetadas con FAM y doble inactivación con inactivadores Zen e Iowa Black. Para el ensayo de genes de referencia tipo TIP41, se usan los cebadores TIPmxF (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:59) y TIPmxR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:60) y la sonda HXTIP (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:61) etiquetada con HEX (hexaclorofluoresceína).

Todos los ensayos incluyen controles negativos sin plantillas (mezcla solamente). Para las curvas estándar, se incluye también un control (agua en un pocillo fuente) en la placa fuente para controlar la contaminación cruzada de las muestras. Las secuencias de cebadores y sondas se indican en la Tabla 6. Las recetas de los componentes de la reacción para la detección de los diversos transcritos se indican en la Tabla 7, y las condiciones de reacción de PCR se resumen en la Tabla 8. La fracción fluorescente FAM (6-Carboxi fluoresceína Amidita) se estimula a 465 nm y se mide la fluorescencia a 510 nm; los valores correspondientes para la fracción fluorescente HEX (hexaclorofluoresceína) son 533 nm y 580 nm.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos usados para los análisis moleculares de los niveles de transcritos en maíz transgénico.

Objetivo	Oligonucleótido	Secuencia
rpII215	RPII215-2v1 FWD Conjunto 1	ACCCAATGAGAGGAGTATCTGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:57)

5	rpII215	RPII215-2v1 REV Conjunto 1	TTTCGGCGTCCAGCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:58)
	rpII215	RPII215-2v1 Conjunto PRB 1	/56-FAM/AACTACCAA/ZEN/GAATGGGCACAGGCT/ 3IABkFQ/ (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:125)
	TIP41	TIPmxF	TGAGGGTAATGCCAACTGGTT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:59)
	TIP41	TIPmxR	GCAATGTAACCGAGTGTCTCTCAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:60)
	TIP41	HXTIP (HEX-Sonda)	TTTTTGCTTAGAGTTGATGGTGTACTGATGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:61)

*Proteína tipo TIP41.

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

	<i>rpII215-2</i>	Gen tipo TIP
Componente	Concentración final	
Tampón Roche	1 X	1X
<i>rpII215</i> (F)	0.4 µM	0
<i>rpII215</i> (R)	0.4 µM	0
<i>rpII215</i> (FAM)	0.2 µM	0
HEXtipZM F	0	0.4 µM
HEXtipZM R	0	0.4 µM
HEXtipZMP (HEX)	0	0.2 µM
ADNc (2.0 µL)	NA	NA
Agua	hasta 10 µL	hasta 10 µL

Tabla 8. Condiciones del termociclador para la qPCR de ARN.

Detección de gen objetivo y de gen tipo TIP41			
Proceso	Temp.	Tiempo	núm. de ciclos
Activación de objetivo	95 °C	10 min	1

Desnaturalizar	95 °C	10 seg	40
Extender	60 °C	40 seg	
Adquirir FAM o HEX	72 °C	1 seg	
Enfriar	40 °C	10 seg	1

5

Los datos se analizan con el uso del software LightCycler™ v1.5 mediante cuantificación relativa con el uso de un algoritmo del máximo por segunda derivada para calcular los valores de Cq de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Para los análisis de expresión, se calculan los valores de expresión con el uso del método $\Delta\Delta C_t$ (es decir, $2^{-(Cq \text{ OBJETIVO} - Cq \text{ REF})}$), que depende de la comparación de las diferencias de los valores de Cq entre dos objetivos, con el valor de base de 2 seleccionado con la suposición de que, para las reacciones de PCR optimizadas, el producto se duplica en cada ciclo.

Tamaño e integridad del transcrito: Ensayo de Transferencia Northern. En algunos casos, la caracterización molecular adicional de las plantas transgénicas se obtiene mediante el uso de un análisis de transferencia northern (transferencia de ARN) para determinar el tamaño molecular del ARNdh de horquilla de *rpII215* en plantas transgénicas que expresan un ARNdh de horquilla de *rpII215*.

Todos los materiales y el equipo se tratan con ARNasaZAP (AMBION/INVITROGEN) antes de usar. Las muestras de tejido (100 mg a 500 mg) se recogen en tubos de 2 mL safelock Eppendorf, se rompen con un pulverizador de tejidos Klecko™ (Garcia Manufacturing, Visalia, CA) con tres perlas de tungsteno en 1 mL de TRIzol (INVITROGEN) durante 5 min, luego se incuban a temperatura ambiente (RT, *por sus siglas en inglés*) durante 10 min. Opcionalmente, las muestras se centrifugan durante 10 min a 4 °C a 11,000 rpm y se transfiere el sobrenadante a un tubo de 2 mL safelock Eppendorf nuevo. Luego de agregar 200 µL de cloroformo al homogeneizado, el tubo se mezcla por inversión durante 2 a 5 min, se incuba a RT durante 10 minutos, y se centrifuga a 12,000 x g durante 15 min a 4 °C. La fase superior se transfiere a un tubo estéril de 1.5 mL Eppendorf, se agregan 600 µL de isopropanol al 100 %, seguido por una incubación a RT durante 10 min a 2 h, y luego se centrifuga a 12,000 x g durante 10 min a 4 °C a 25 °C. El sobrenadante se desecha y el sedimento de ARN se lava dos veces con 1 mL de etanol al 70 %, con centrifugación a 7,500 x g durante 10 min a 4 °C a 25 °C entre los lavados. Se desecha el etanol y el sedimento se seca brevemente al aire durante 3 a 5 min antes de resuspenderse en 50 µL de agua libre de nucleasa.

El ARN total se cuantifica con el uso de Nanodrop 8000[®] (Thermo-Fisher) y las muestras se normalizan a 5 µg/10 µL. Se agregan luego 10 µL de glioxal (AMBION/INVITROGEN) a cada muestra. Se colocan cinco a 14 ng de mezcla de marcadores estándar de ARN DIG (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) y se agrega a un volumen igual de glioxal. Las muestras y los ARN marcadores se desnaturalizan a 50 °C durante 45 min y se almacenan en hielo hasta que se cargan en un gel de agarosa SeaKem gold al 1.25 % (Lonza, Allendale, NJ) en un tampón de corrida de glioxal 10 X NorthernMax (AMBION/INVITROGEN). Los ARN se separan mediante electroforesis a 65 voltios/30 mA durante 2 horas y 15 minutos.

Luego de la electroforesis, el gel se enjuaga en SSC 2X durante 5 min y se adquiere una imagen en una estación gel doc (BioRad, Hercules, CA), luego el ARN se transfiere pasivamente a una membrana de nailon (Millipore) durante la noche a RT, con SSC 10X como tampón de transferencia (SSC 20X consta de 3 M de cloruro de sodio y 300 mM de citrato de trisodio, pH 7.0). Luego de la transferencia, la membrana se enjuaga en SSC 2X durante 5 minutos, el ARN se reticula por UV a la membrana (Agilent/Stratagene), y se deja secar la membrana a temperatura ambiente durante un período de hasta 2 días.

La membrana se prehibrida en un tampón UltraHyb[™] (AMBION/INVITROGEN) durante 1 a 2 h. La sonda consta de un producto amplificado por PCR que contiene la secuencia de interés (por ejemplo, la porción de la secuencia antisentido de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7-9, o 117, según corresponda) etiquetada con digoxigenina por medio de un procedimiento Roche Applied Science DIG. La hibridación en el tampón recomendado se realiza durante la noche a una temperatura de 60 °C en tubos de hibridación. Luego de la hibridación, la membrana de transferencia se somete a lavados con DIG, se envuelve, se expone a una película durante 1 a 30 minutos, luego la película se revela, todo mediante métodos recomendados por el proveedor del conjunto DIG.

Determinación de la cantidad de copias de transgenes. Las piezas de hojas de maíz aproximadamente equivalentes a 2 perforaciones de hojas se recogen en placas de recolección de 96 pocillos (Qiagen). La ruptura del tejido se realiza con un pulverizador de tejidos Klecko[™] (Garcia Manufacturing, Visalia, CA) en un tampón de lisis Biosprint96 AP1 (suministrado con un estuche Biosprint96 PLANT; Qiagen) con una perla de acero inoxidable. Luego de la maceración del tejido, se aísla el ADNg en un formato de alto rendimiento con el uso de un estuche Biosprint96 PLANT y un robot de extracción Biosprint96. El ADNg se diluye en 1:3 de ADN:agua antes de configurar la reacción de qPCR.

Análisis de qPCR. La detección de transgenes mediante un ensayo de sondas de hidrólisis se realiza mediante PCR en tiempo real con un sistema LightCycler® 480. Los oligonucleótidos que se usarán en los ensayos de sondas de hidrólisis para detectar el gen objetivo (por ejemplo, *rp215*), la secuencia enlazante, y/o detectar una porción del gen *SpecR* (es decir, el gen de resistencia a la espectinomicina contenido en los plásmidos vectores binarios; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:62; oligonucleótidos SPC1 en la Tabla 9) se diseñan con el uso del software de diseño de sondas LightCycler® 2.0. Además, los oligonucleótidos que se usarán en los ensayos de sondas de hidrólisis para detectar un segmento del gen *AAD-1* de tolerancia a herbicidas (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:63; oligonucleótidos GAAD1 en la Tabla 9) se diseñan con el uso del software Primer Express (Applied Biosystems). La Tabla 9 muestra las secuencias de cebadores y sondas. Los ensayos se realizan en formato múltiple con reactivos para un gen cromosómico de maíz endógeno (Invertasa (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:64; núm. de acceso al GenBank: U16123; mencionado en la presente como IVR1), que sirve como una secuencia de referencia interna para asegurarse de que el ADNg se halle presente en cada ensayo. Para la amplificación, se prepara una mezcla maestra de sondas LightCycler® 480 (Roche Applied Science) a una concentración final 1x en una reacción múltiple de 10 µL de volumen que contiene 0.4 µM de cada cebador y 0.2 µM de cada sonda (Tabla 10). Se realiza una reacción de amplificación en dos pasos de acuerdo con lo resumido en la Tabla 11. La activación de fluoróforos y la emisión para las sondas etiquetadas con FAM y HEX son de acuerdo a lo descrito anteriormente; los conjugados de CY5 se estimulan lo máximo a 650 nm y fluorescen a un máximo de 670 nm.

Los puntajes de Cp (el punto en el que la señal de fluorescencia cruza el umbral de fondo) se determinan a partir de los datos de la PCR en tiempo real con el algoritmo de puntos de ajuste (Software LightCycler® versión 1.5) y el módulo Relative Quant (basado en el método $\Delta\Delta Ct$). Los datos se manejan de la manera descrita anteriormente (más arriba; en qPCR de ARN).

Tabla 9. Secuencias de cebadores y sondas (con conjugado fluorescente) usados para determinaciones de la cantidad de copias de genes y la detección de la estructura principal del plásmido vector binario.

Nombre	Secuencia
GAAD1-F	TGTTTCGGTTCCTCTACCAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:65)
GAAD1-R	CAACATCCATCACCTTGACTGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:66)

	GAAD1-P (FAM)	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:67)
	IVR1-F	TGGCGGACGACGACTTGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:68)
	IVR1-R	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:69)
5	IVR1-P (HEX)	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:70)
	SPC1A	CTTAGCTGGATAACGCCAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:71)
	SPC1S	GACCGTAAGGCTTGATGAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:72)
	TQSPEC (CY5*)	CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:73)
10	Loop_F	GGAACGAGCTGCTTGCGTAT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:74)
	Loop_R	CACGGTGCAGCTGATTGATG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:75)
	Loop_FAM	TCCCTTCCGTAGTCAGAG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76)

CY5 = Cianina-5

Tabla 10. Componentes de la reacción para los análisis de la cantidad de copias de genes y la detección de la estructura principal del plásmido.

Componente	Cant. (μL)	Reserva	Conc. final
Tampón 2x	5.0	2x	1x
Cebador 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 de IVR1	0.4	10 μM	0.4
Cebador inverso de IVR1	0.4	10 μM	0.4
Sonda de IVR1	0.4	5 μM	0.2
H ₂ O	0.6	NA*	NA
ADNg	2.0	ND**	ND
Total	10.0		

*NA = No aplicable

**ND = No Determinado/a

Tabla 11. Condiciones del termociclador para la qPCR de ADN.

Análisis de la cantidad de copias genómicas			
Proceso	Temp.	Tiempo	núm. de ciclos
Activación del objetivo	95 °C	10 min	1
Desnaturalizar	95 °C	10 s	40
Extender y adquirir FAM, HEX, o CY5	60 °C	40 s	
Enfriar	40 °C	10 s	1

Ejemplo 8: Bioensayo de maíz transgénico

Bioensayos de insectos. La bioactividad del ARNdh de la presente invención producido en células vegetales se demuestra mediante métodos de bioensayo. Véase, por ejemplo, Baum *et al.* (2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-1326. Se puede demostrar la eficacia, por ejemplo, al alimentar a los insectos objetivo con diversos tejidos vegetales o piezas de tejido derivadas de una planta que produce un ARNdh insecticida en un ambiente de alimentación controlado. Alternativamente, se preparan extractos de diversos tejidos vegetales derivados de una planta que produce el ARNdh insecticida, y los ácidos nucleicos extraídos se colocan en la parte superior de las dietas artificiales para los bioensayos como se describió anteriormente en la presente. Los resultados de tales ensayos de alimentación se comparan con bioensayos realizados de manera similar que emplean tejidos de control adecuados de plantas huéspedes que no producen un ARNdh insecticida, o con otras muestras de control. El crecimiento y la supervivencia de los insectos objetivo en la dieta de la prueba se reduce en comparación con aquellos del grupo de control.

Bioensayos de insectos con eventos de maíz transgénico. Se seleccionan dos larvas de gusano de la raíz del maíz occidental (1 a 3 días de edad) que salieron de huevos lavados y se colocan en cada pocillo de la bandeja de bioensayo. Los pocillos se cubren luego con una cubierta de pestaña Pull'Peel™ (BIO-CV-16, BIO-SERV) y se colocan en una incubadora a 28 °C con un ciclo de 18 h/6 h de luz/oscuridad. A los nueve días de la infestación inicial, se evalúa la mortalidad de las larvas, que se calcula como el porcentaje de insectos muertos de la cantidad total de insectos en cada tratamiento. Las muestras de insectos se congelan a -20 °C durante 2 días, luego las larvas de insectos de cada

tratamiento se agrupan y pesan. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calcula como el peso medio de los tratamientos experimentales dividido por la media del peso promedio de dos tratamientos de pocillos de control. Los datos se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento (de los controles negativos). Los pesos medios que exceden del peso medio de control se normalizan a cero.

Bioensayos de insectos en el invernadero. Los huevos del gusano de la raíz del maíz occidental (WCR, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) se reciben en suelo de CROP CHARACTERISTICS (Farmington, MN). Los huevos de WCR se incuban a 28 °C durante 10 a 11 días. Los huevos se lavan para eliminar los restos del suelo, se colocan en una solución de agar al 0.15 % y se ajusta la concentración hasta aproximadamente 75 a 100 huevos por fracción de 0.25 mL. Una placa de eclosión se coloca en una placa Petri con una fracción de la suspensión de huevos para monitorear las tasas de eclosión.

El suelo alrededor de las plantas de maíz cultivadas en ROOTRANERS[®] se infesta con 150 a 200 huevos de WCR. Se permite que los insectos se alimenten durante 2 semanas, luego de lo cual se proporciona una "Clasificación de Raíces" a cada planta. Se utiliza una escala de Lesión de nodos para la calificación, esencialmente de acuerdo con Oleson *et al.* (2005) J. Econ. Entomol. 98:1-8. Las plantas que superan este bioensayo, que muestran una lesión reducida, se trasplantan a macetas de 5 galones para la producción de semillas. Los trasplantes se tratan con insecticida para evitar el daño adicional por gusanos de la raíz y la liberación de insectos en el invernadero. Las plantas se polinizan manualmente para la producción de semillas. Las semillas producidas por estas plantas se guardan para la evaluación en las generaciones de plantas T₁ y posteriores.

Las plantas transgénicas de control negativo se generan mediante la transformación con vectores que alojan genes diseñados para producir una proteína fluorescente amarilla (YFP). Las plantas de control negativo no transformadas se cultivan a partir de semillas de variedades de maíz parentales de las que se produjeron las plantas transgénicas. Los bioensayos se realizan con controles negativos incluidos en cada conjunto de materiales vegetales.

Ejemplo 9: *Zea mays* transgénico que comprende secuencias de plagas de coleópteros

Se generan 10-20 plantas transgénicas T₀ de *Zea Mays* de acuerdo con lo descrito en el EJEMPLO 6. Se obtienen otras 10-20 líneas T₁ de *Zea mays* independientes que expresan el ARNdh de horquilla para un constructo de iARN para la estimulación del gusano de la raíz del maíz. El ARNdh de horquilla comprende una porción de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95, SEC. CON NÚM. DE

IDENT.:96, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:97, y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:118 (por ejemplo, el ARNdh de horquilla transcrito a partir de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:124). Los ARNdh de horquilla adicionales se derivan, por ejemplo, de secuencias de plagas de coleópteros como, por ejemplo, Caf1-180 (Publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2012/0174258),
5 VatpaseC (Publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2012/0174259), Rho1 (Publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2012/0174260), VatpaseH (Publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2012/0198586), PPI-87B (Publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2013/0091600), RPA70 (Publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2013/0091601), RPS6 (Publicación de solicitud de
10 patente de los Estados Unidos núm. 2013/0097730), *ROP* (Solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 14/577811), *RNAPIII40* (Solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 14/577,854), *Dre4* (Solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 14/705,807), *ncm* (Solicitud de patente de los Estados Unidos núm.62/095487), *COPI alpha* (Solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/063,199), *COPI beta* (Solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/063,203), *COPI gamma*
15 (Solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/063,192), o *COPI delta* (Solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 62/063,216). Se confirman a través de RT-PCR u otros métodos de análisis molecular.

Las preparaciones de ARN total de líneas T₁ independientes seleccionadas se usan opcionalmente para RT-PCR con cebadores diseñados para unirse en el enlazante del casete de expresión de horquilla
20 en cada uno de los constructos de iARN. Además, los cebadores específicos para cada gen objetivo en un constructo de iARN se usan opcionalmente para amplificar y confirmar la producción del ARNm preprocesado requerido para la producción de ARNip *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión del ARN de horquilla en cada planta transgénica de *Zea mays*. Opcionalmente, el procesamiento de la horquilla de ARNdh de los genes
25 objetivo a ARNip se confirma posteriormente en líneas transgénicas independientes con el uso de hibridaciones con membrana de transferencia de ARN.

Por otra parte, las moléculas de ARNi que tienen secuencias con faltas de coincidencia con más de un 80 % de identidad de secuencias respecto a los genes objetivo afectan a los gusanos de la raíz del maíz de manera similar a la observada con las moléculas de ARNi que tienen una identidad de secuencias
30 del 100 % respecto a los genes objetivo. El apareamiento de la secuencia con faltas de coincidencia con secuencias nativas para formar un ARNdh de horquilla en el mismo constructo de iARN

proporciona ARNip procesados por la planta capaces de afectar el crecimiento, el desarrollo y la viabilidad de las plagas de coleópteros que se alimentan de ella.

La administración *in planta* de ARNdh, ARNip, o miARN correspondientes a genes objetivo y la captación posterior por plagas de coleópteros a través de la alimentación resulta en la regulación negativa de los genes objetivo en la plaga de coleópteros a través del silenciamiento génico mediado por ARN. Cuando la función de un gen objetivo es importante en una o más etapas del desarrollo, se afecta el crecimiento y/o el desarrollo de la plaga de coleópteros y, en el caso de al menos uno de WCR, NCR, SCR, MCR, *D. balteata* LeConte, *D. speciosa* Germar, *D. u. tenella*, y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim, conduce a la imposibilidad de infestar, alimentarse, y/o desarrollarse exitosamente, o a la muerte de la plaga de coleópteros. La elección de genes objetivo y la aplicación exitosa de la iARN se usan entonces para controlar plagas de coleópteros.

Comparación fenotípica de líneas de iARN transgénicas y *Zea mays* no transformado. Los genes o las secuencias objetivo de plagas de coleópteros seleccionados para crear ARNdh de horquilla no tienen similitud con ninguna secuencia de genes vegetales conocida. Por ende, no se espera que la producción o la activación de la iARN (sistémica) mediante constructos dirigidos a estos genes o secuencias de plagas de coleópteros tengan algún efecto perjudicial en las plantas transgénicas. Sin embargo, las características del desarrollo y morfológicas de las líneas transgénicas se comparan con las de plantas no transformadas así como también con las de aquellas líneas transgénicas transformadas con un vector "vacío" que no tiene ningún gen que exprese una horquilla. Se comparan las características de las raíces, brotes, follaje y reproducción de las plantas. Se registran las características de los brotes de las plantas como, por ejemplo, altura, cantidad y tamaño de las hojas, momento de floración, tamaño y apariencia de las flores. En general, no existen diferencias morfológicas observables entre las líneas transgénicas y aquellas sin la expresión de moléculas de ARNi objetivo cuando se cultivan *in vitro* y en el suelo en el invernadero.

Ejemplo 10: *Zea mays* transgénico que comprende una secuencia de plagas de coleópteros y constructos de iARN adicionales

Una planta transgénica de *Zea mays* que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe a una molécula de ARNi dirigida a un organismo que no pertenece a una plaga de coleópteros se transforma 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 ARNdh insecticidas (por ejemplo, al menos una molécula de ARNdh que incluye

una molécula de ARNdh dirigida a un gen que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3 y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5). Los vectores plasmídicos de transformación de plantas preparados esencialmente de acuerdo con lo descrito en el EJEMPLO 4 se administran por medio de métodos de transformación mediada por *Agrobacterium* o WHISKERS™ a células en suspensión de maíz o embriones inmaduros de maíz obtenidos de una planta de *Zea mays* transgénica Hi II o B104 que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe a una molécula de ARNi dirigida a un organismo que no pertenece a una plaga de coleópteros.

Ejemplo 11: *Zea mays* transgénico que comprende un constructo de iARN y secuencias de control adicionales de plagas de coleópteros

Una planta transgénica de *Zea mays* que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe a una molécula de ARNi dirigida a un organismo de una plaga de coleópteros (por ejemplo, al menos una molécula de ARNdh que incluye una molécula de ARNdh dirigida a un gen que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3, y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5) se transforma secundariamente por medio de metodologías que utilizan *Agrobacterium* o WHISKERS™ (véase, Petolino y Arnold (2009) Methods Mol. Biol. 526:59-67) para producir una o más moléculas de proteínas insecticidas, por ejemplo, proteínas insecticidas Cry3, Cry34 y Cry35. Los vectores plasmídicos de transformación de plantas preparados esencialmente de acuerdo a lo descrito en el EJEMPLO 4 se administran por medio de métodos de transformación mediada por *Agrobacterium* o WHISKERS™ a células en suspensión de maíz o embriones inmaduros de maíz obtenidos de una planta transgénica B104 de *Zea mays* que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe a una molécula de ARNi dirigida a un organismo de una plaga de coleópteros. Se obtienen plantas doblemente transformadas que producen moléculas de ARNi y proteínas insecticidas para el control de plagas de coleópteros.

Ejemplo 12: Cribaje de genes objetivo candidatos en chinches café neotropicales (*Euschistus heros*) Colonia de chinches café neotropicales (BSB; *Euschistus heros*). Se criaron BSB en una incubadora a 27°C, a una humedad relativa del 65 %, con un ciclo de 16:8 horas de luz:oscuridad. Se sembró un gramo de huevos recogidos durante 2-3 días en recipientes de 5 L con discos de papel filtro en la parte inferior, y los recipientes se cubrieron con una malla #18 para la ventilación. Cada recipiente de cría proporcionó aproximadamente 300-400 BSB adultos. En todas las etapas, los insectos se alimentaron

con ejotes frescos tres veces por semana, y se reemplazó una vez por semana una bolsita de mezcla de semillas que contenía semillas de girasol, frijoles de soja y cacahuates (relación en peso 3:1:1). Se proveyó agua en frascos con tapones de algodón como mechas. Luego de las dos semanas iniciales, los insectos se transfirieron a un nuevo recipiente una vez por semana.

- 5 Dieta artificial del BSB. Se preparó una dieta artificial para el BSB de la siguiente manera. Se procesaron ejotes liofilizados hasta obtener un polvo fino en una procesadora MAGIC BULLET® mientras se procesaban cacahuates crudos (orgánicos) en una procesadora separada MAGIC BULLET®. Los ingredientes procesados secos se combinaron (porcentajes en peso: ejotes, 35 %; cacahuates, 35 %; sacarosa, 5 %; complejo vitamínico (por ejemplo, mezcla vitamínica Vanderzant para insectos, SIGMA-ALDRICH, núm. de Catálogo V1007), 0.9 %); en una procesadora MAGIC BULLET® grande, que se tapó y agitó bien para mezclar los ingredientes. Los ingredientes secos mezclados se agregaron luego a un tazón de mezcla. En un recipiente separado, se mezclaron bien agua y un agente antifúngico de benomil (50 ppm; 25 µL de una solución de 20,000 ppm/50 mL de solución de dieta) y luego se agregaron a la mezcla de ingredientes secos. Todos los ingredientes se
10 mezclaron manualmente hasta que la solución se combinó completamente. La dieta se conformó en tamaños deseados, se envolvió sin apretar con una hoja de aluminio, se calentó durante 4 horas a 60 °C, y luego se enfrió y almacenó a 4 °C. La dieta artificial se usó dentro de dos semanas de preparación.

- Ensamble de transcriptomas de BSB. Se seleccionaron seis etapas de desarrollo del BSB para la
20 preparación de la biblioteca de ARNm. El ARN total se extrajo de insectos congelados a -70 °C, y se homogeneizó en 10 volúmenes de tampón de lisis/unión en tubos de 2 mL de matriz de lisis A (MP BIOMEDICALS, Santa Ana, CA) en un instrumento FastPrep®-24 Instrument (MP BIOMEDICALS). El ARNm total se extrajo con un estuche de aislamiento de miARN mirVana™ (AMBION; INVITROGEN) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La secuenciación del ARN
25 con un sistema illumina® HiSeq™ (San Diego, CA) proporcionó secuencias de genes objetivo candidatos para usar en la tecnología de control de insectos mediante la iARN. El sistema HiSeq™ generó un total de aproximadamente 378 millones de lecturas para las seis muestras. Las lecturas se ensamblaron individualmente para cada muestra con el uso del software de ensamble TRINITY™ (Grabherr *et al.* (2011) Nature Biotech. 29:644-652). Los transcritos ensamblados se combinaron para
30 generar un transcriptoma agrupado. Este transcriptoma agrupado de BSB contenía 378,457 secuencias.

Identificación del ortólogo de *rpII215* de BSB. Se realizó una búsqueda tBLASTn del transcriptoma agrupado de BSB con el uso como consulta, del *rpII-215 de Drosophila* (secuencia de proteína con núm. de acceso al GenBank ABI30983). Se identificaron *rpII215-1* de BSB (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77), *rpII215-2* de BSB (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79), y *rpII215-3* de BSB (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81) como genes *rpII215* objetivo candidatos de *Euschistus heros*, cuyos productos tienen las secuencias peptídicas predichas, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:80, y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:82, respectivamente.

Preparación de plantillas y síntesis del ARNd_h. Se preparó ADN_c a partir del ARN total de BSB extraído de un único insecto adulto joven (aproximadamente 90 mg) con el uso del reactivo TRIzol[®] (LIFE TECHNOLOGIES). El insecto se homogeneizó a temperatura ambiente en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con 200 µL de TRIzol[®] con una mano de mortero para sedimentos (FISHERBRAND Catálogo núm. 12-141-363) y un mezclador de motor con mano de mortero (COLE-PARMER, Vernon Hills, IL). Luego de la homogeneización, se agregaron unos 800 µL adicionales de TRIzol[®], se agitó por vórtice el homogeneizado, y luego se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos. Los residuos celulares se retiraron mediante centrifugación y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. De acuerdo con el protocolo de extracción de TRIzol[®] recomendado por el fabricante para 1 mL de TRIzol[®], el sedimento de ARN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 200 µL de tampón de Tris de un estuche de extracción de gel y ADN por GFX PCR (Illustra[™]; GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES) con el uso del tampón de elución Tipo 4 (es decir, 10 mM de Tris-HCl; pH8.0). La concentración de ARN se determinó con el uso de un espectrofotómetro NanoDrop[™] 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Amplificación de ADN_c. El ADN_c se transcribió inversamente a partir de 5 µg de la plantilla de ARN total de BSB y el cebador oligo dT, con el uso de un sistema de síntesis de primera hebra SUPERScript III FIRST-STRAND SYNTHESIS SYSTEM[™] para RT-PCR (INVITROGEN), de acuerdo con el protocolo recomendado del proveedor. El volumen final de la reacción de transcripción se llevó a 100 µL con agua libre de nucleasa.

Los cebadores que se muestran en la Tabla 12 se usaron para amplificar *reg1* de BSB_*rpII215-1*, *reg1* de BSB_*rpII215-2*, y *reg1* de BSB_*rp215-3*. La plantilla de ADN se amplificó mediante "PCR touchdown" (temperatura de hibridación disminuida de 60 °C a 50 °C, en una disminución de 1 °C/ciclo) con 1 µL de ADN_c (mencionado anteriormente) como plantilla. Los fragmentos que comprenden un segmento de 490 pb de la *reg1* de BSB_*rp215-1* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83),

un segmento de 369 pb de la reg1 de BSB_*rpII215-2* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:84), y un segmento de 491 pb de la reg1 de BSB_*rpII215-3* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85) se generaron durante 35 ciclos de PCR. El procedimiento mencionado anteriormente también se usó para amplificar la plantilla de YFPv2 de control negativo de 301 pb (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:92), con el uso de los cebadores YFPv2-F (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93) y YFPv2-R (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:94). Los cebadores de *reg1* de BSB_*rpII215-1*, *reg1* de BSB_*rpII215-2*, *reg1* de BSB_*rpII215-3*, y YFPv2 contenían una secuencia promotora de fago T7 (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10) en sus extremos 5' y, de este modo, permitían el uso de fragmentos de ADN de YFPv2 y BSB_*rpII215* para la transcripción del ARNdh.

Tabla 12. Cebadores y pares de cebadores usados para amplificar porciones de regiones codificantes de genes *rpII215* objetivo ejemplares y un gen *YFP* de control negativo.

	Id. del gen	Id. del cebador	Secuencia
15	Par 20 <i>rpII215-1</i> reg1	BSB_ <i>rpII215-1</i> _For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCCCAGGCTGCTCCAGGTGAAATGGTT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:86)
		BSB_ <i>rpII215-1</i> _Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACATCACCGAAA CCAGCATTGATTTTTTCAG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87)
20	Par 21 <i>rpII215-2</i> reg1	BSB_ <i>rpII215-2</i> _For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGCCTTCTTCA GTCGCCAGCTTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 88)
		BSB_ <i>rpII215-2</i> _Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACACACGCATCG GAGTATTTTAATAG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:89)
25	Par 22 <i>rpII215-3</i> reg1	BSB_ <i>rpII215-3</i> _For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCAGGAGCAAA TTATGTGATCAGAAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:90)
		BSB_ <i>rpII215-3</i> _Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGTCTAGTCCG ATGTCATTGTAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:91)
30	Par 23 YFP	YFPv2-F	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCATCTGGAGC ACTTCTCTTTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93)
		YFPv2-R	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCATCTCCTTCA AAGGTGATTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:94)

Síntesis de ARNdh. El ARNdh se sintetizó con el uso de 2 μ L del producto de la PCR (mencionado anteriormente) como plantilla con un estuche de iARN T7 MEGAscript™ (AMBION) usado según las instrucciones del fabricante. Véase la Figura 1. El ARNdh se cuantificó en un espectrofotómetro NANODROP™, y se diluyó hasta 500 ng/ μ L en tampón TE 0.1X libre de nucleasas (1 mM de Tris HCL, 0.1 mM de EDTA, pH 7.4).

Inyección de ARNdh en hemocoel de BSB

Se criaron BSB a base de una dieta basada en ejotes y semillas, como la colonia, en una incubadora a 27 °C a una humedad relativa de 65 % y un fotoperíodo de 16:8 horas de luz:oscuridad. Ninfas de segundo instar (cada una de las cuales pesaba de 1 a 1.5 mg) se manipularon suavemente con un cepillo pequeño para evitar lesiones y se colocaron en una placa Petri sobre hielo para enfriar e inmovilizar a los insectos. Se inyectó en cada insecto 55.2 nL de solución de ARNdh a 500 ng/ μ L (es decir, 27.6 ng de ARNdh; dosis de 18.4 a 27.6 μ g/g de peso corporal). Las inyecciones se realizaron con el uso de un inyector NANOJECT™ II (DRUMMOND SCIENTIFIC, Broomhall, PA), equipado con una aguja de inyección que se extrajo de un capilar de vidrio Drummond de 3.5 pulgadas #3-000-203-G/X. La punta de la aguja se rompió, y el capilar se volvió a llenar con aceite mineral liviano y luego se llenó con 2 a 3 μ L de ARNdh. El ARNdh se inyectó en el abdomen de las ninfas (10 insectos inyectados por ARNdh por ensayo), y los ensayos se repitieron en tres días diferentes. Los insectos inyectados (5 por pocillo) se transfirieron a bandejas de 32 pocillos (Bandeja de cría Bio-RT-32; BIO-SERV, Frenchtown, NJ) que contenían una torta de dieta artificial para BSB y se cubrieron con cubiertas de pestaña Pull-N-Peel™ (BIO-CV-4; BIO-SERV). Se suministró humedad por medio de 1.25 mL de agua en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con una mecha de algodón. Las bandejas se incubaron a 26.5°C, 60 % de humedad y un fotoperíodo de 16:8 horas de luz:oscuridad. Se tomaron conteos de la viabilidad y los pesos el día 7 luego de las inyecciones.

rpII215 de BSB es un objetivo de ARNdh letal

De acuerdo con el resumen de la Tabla 13, en cada réplica, se inyectaron al menos diez ninfas de BSB de segundo instar (1-1.5 mg cada una) en el hemocoel con 55.2 nL de ARNdh de reg1 de BSB_*rpII215-1*, reg1 de BSB_*rpII215-2*, o reg1 de BSB_*rpII215-3* (500 ng/ μ L), para una concentración final aproximada de 18.4-27.6 μ g de ARNdh/g de insecto. La mortalidad determinada para ARNdh de reg1 de BSB_*rpII215-1* y reg1 de BSB_*rpII215-2* fue mayor que la observada con la misma cantidad de ARNdh de *YFP v2* inyectado (control negativo). La mortalidad determinada

para *reg1* de BSB_ *rpII215-1* y *reg1* de BSB_ *rpII215-2* fue significativamente diferente con $p < 0.05$ (prueba t de Student).

Tabla 13. Resultados de la inyección de ARNdh de BSB_ *rpII215* en el hemocoel de ninfas de chinches café neotropicales de segundo instar a los siete días luego de la inyección.

5		Tratamiento*	N ensayos	Media del % de mortalidad $\pm$ SEM**	prueba t valor p
		BSB <i>rpII215-1 reg1</i>	3	70 ± 15	1.55E-02***
		BSB <i>rpII215-2 reg1</i>	3	70 ± 5.8	6.85E-04***
10		BSB <i>rpII215-3 reg1</i>	3	17 ± 8.8	3.49E-01
		No inyectado	3	10 ± 8.8	6.43E-01
		<i>YFPv2</i>	3	7 ± 3.3	

*Diez insectos inyectados por ensayo para cada ARNdh.

15 **Error estándar de la media.

***Significativamente diferente del control de ARNdh de *YFPv2* con el uso de una prueba t de Student. ($p < 0.05$).

Ejemplo 13: *Zea mays* transgénico que comprende secuencias de plagas de hemípteros

20 Se generan de diez a 20 plantas transgénicas T_0 de *Zea mays* que alojan vectores de expresión para ácidos nucleicos que comprenden cualquier porción de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, y/o 81 (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85) de acuerdo con lo descrito en el EJEMPLO 4. Se obtienen otras 10-20 líneas T_1 de *Zea mays* independientes que expresan el ARNdh de horquilla para un constructo de iARN para la estimulación de BSB. Se obtienen ARNdh de

25 horquilla que tienen una porción de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, y/o 81 o sus segmentos (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85). Se confirman mediante RT-PCR u otros métodos de análisis molecular. Las preparaciones de ARN total a partir de líneas T_1 independientes seleccionadas se usan opcionalmente para la RT-PCR con cebadores diseñados para unirse en el intrón enlazante del casete de expresión de horquilla en cada uno de los constructos de iARN.

30 Además, se usan opcionalmente cebadores específicos para cada gen objetivo en un constructo de iARN a fin de amplificar y confirmar la producción del ARNm preprocesado requerido para la

producción de ARNip *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión del ARN de horquilla en cada planta transgénica de *Zea mays*. El procesamiento del ARNdh de horquilla de los genes objetivo a ARNip se confirma luego opcionalmente en líneas transgénicas independientes con el uso de hibridaciones con membrana de transferencia de ARN.

Por otra parte, las moléculas de ARNi que tienen secuencias con faltas de coincidencia con más de 80 % de identidad de secuencias respecto a los genes objetivo afectan a los hemípteros de manera similar a la observada con moléculas de ARNi que tienen 100 % de identidad de secuencias respecto a los genes objetivo. El apareamiento de la secuencia con faltas de coincidencia con secuencias nativas para formar un ARNdh de horquilla en el mismo constructo de iARN proporciona ARNip procesados por la planta capaces de afectar el crecimiento, el desarrollo y la viabilidad de las plagas de hemípteros que se alimentan de ella.

La administración *in planta* de ARNdh, ARNip, ARNhp, ARNhorq, o miARN correspondientes a genes objetivo y la captación posterior por las plagas de hemípteros a través de la alimentación resulta en la regulación negativa de los genes objetivo en la plaga de hemípteros a través del silenciamiento génico mediado por ARN. Cuando la función de un gen objetivo es importante en una o más etapas del desarrollo, el crecimiento, el desarrollo y/o la supervivencia de la plaga de hemípteros se afectan y, en el caso de al menos uno de *Euschistus heros*, *E. servus*, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, *Halyomorpha halys*, *Chinavia hilare*, *C. marginatum*, *Dichelops melacanthus*, *D. furcatus*; *Edessa mediotabunda*, *Thyanta perditor*, *Horcias nobilellus*, *Taedia stigmosa*, *Dysdercus peruvianus*, *Neomegalotomus parvus*, *Leptoglossus zonatus*, *Niesthrea sidae*, *Lygus hesperus*, y *L. lineolaris*, conduce a que la plaga de hemípteros no pueda infestar, alimentarse o desarrollarse exitosamente, y/o conduce a la muerte de la plaga de hemípteros. La elección de los genes objetivo y la aplicación exitosa de la iARN se usan entonces para controlar las plagas de hemípteros.

Comparación fenotípica de líneas de iARN transgénicas y *Zea mays* no transformado. Los genes o las secuencias de plagas de hemípteros objetivo seleccionados para crear ARNdh de horquilla no tienen similitud con ninguna secuencia de genes vegetales conocida. Por ende, no se espera que la producción o activación de la iARN (sistémica) por los constructos dirigidos a estos genes o secuencias de plagas de hemípteros tengan algún efecto perjudicial en las plantas transgénicas. Sin embargo, las características del desarrollo y morfológicas de las líneas transgénicas se comparan con las de plantas no transformadas así como también con las de aquellas líneas transgénicas

transformadas con un vector "vacío" que no tiene ningún gen que exprese una horquilla. Se comparan las características de las raíces, brotes, follaje y reproducción de las plantas. No existe diferencia observable en los patrones de crecimiento y longitud de las raíces de plantas transgénicas y no transformadas. Las características de los brotes de las plantas como, por ejemplo, altura, cantidad y tamaño de las hojas, momento de la floración, tamaño y apariencia de las flores son similares. En general, no existen diferencias morfológicas observables entre las líneas transgénicas y aquellas sin expresión de moléculas de ARNi objetivo cuando se cultivan *in vitro* y en el suelo en el invernadero.

Ejemplo 14: *Glycine max* transgénica que comprende secuencias de plagas de hemípteros

Se generan de diez a 20 plantas transgénicas T₀ de *Glycine max* que alojan vectores de expresión para ácidos nucleicos que comprenden una porción de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, 81, o sus segmentos (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85) de acuerdo con lo que se conoce en la técnica, que incluye, por ejemplo, la transformación mediada por *Agrobacterium*, tal como se indica a continuación. Se esterilizan semillas maduras de soja (*Glycine max*) durante la noche con gas de cloro durante dieciséis horas. Luego de la esterilización con gas de cloro, las semillas se colocan en un recipiente abierto en una campana de flujo Laminar™ para disipar el gas de cloro. A continuación, las semillas esterilizadas se embeben con H₂O estéril durante dieciséis horas en la oscuridad con el uso de una caja negra a 24 °C.

Preparación de frijoles de soja de semillas divididas. Las semillas de soja divididas que comprenden una porción de un protocolo de eje embrionario requiere la preparación del material de semillas de soja que se corta longitudinalmente con una hoja núm. 10 fijada a un escalpelo, a lo largo del hilo de la semilla para separar y retirar la cubierta de la semilla, y dividir la semilla en dos secciones cotiledóneas. Debe prestarse especial atención para retirar parcialmente el eje embrionario, en donde aproximadamente 1/2–1/3 del eje embrionario permanece fijado al extremo nodal del cotiledón.

Inoculación. Las semillas de soja divididas que comprenden una porción parcial del eje embrionario se sumergen luego durante aproximadamente 30 minutos en una solución de *Agrobacterium tumefaciens* (por ejemplo, cepa EHA 101 o EHA 105) que contiene un plásmido binario que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, 81, y/o sus segmentos (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83-85). La solución de *A. tumefaciens* se diluye hasta una concentración final de $\lambda=0.6$ a DO₆₅₀ antes de sumergir los cotiledones que comprenden el eje embrionario.

Cocultivo. Luego de la inoculación, la semilla de soja dividida se deja cocultivar con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* durante 5 días en un medio de cocultivo (*Agrobacterium* Protocols, vol. 2,

2ª Ed., Wang, K. (Ed.) Humana Press, Nueva Jersey, 2006) en una placa Petri cubierta con una pieza de papel filtro.

Inducción de brotes. Luego de 5 días de cocultivo, las semillas de soja divididas se lavan en medio líquido de inducción de brotes (SI, *por sus siglas en inglés*) que consiste en sales de B5, vitaminas B5, 28 mg/L de hierro, 38 mg/L de Na₂EDTA, 30 g/L de sacarosa, 0.6 g/L de MES, 1.11 mg/L de BAP, 100 mg/L Timentin™, 200 mg/L de cefotaxima, y 50 mg/L de vancomicina (pH 5.7). Las semillas de soja divididas se cultivan luego en medio de inducción de brotes I (SI I) que consiste en sales de B5, vitaminas B5, 7 g/L de agar Noble, 28 mg/L de hierro, 38 mg/L de Na₂EDTA, 30 g/L de sacarosa, 0.6 g/L de MES, 1.11 mg/L de BAP, 50 mg/L de Timentin™, 200 mg/L de cefotaxima, y 50 mg/L de vancomicina (pH 5.7), con el lado plano del cotiledón hacia arriba y el extremo nodal del cotiledón embebido en el medio. Luego de 2 semanas de cultivo, los explantos de las semillas de soja divididas se transfieren al medio de inducción de brotes II (SI II) que contiene el medio SI complementado con 6 mg/L de glufosinato (Liberty®).

Elongación de brotes. Luego de 2 semanas de cultivo en medio SI II, los cotiledones se retiran de los explantos y se escinde una almohadilla lisa de brote que contiene el eje embrionario mediante un corte en la base del cotiledón. La almohadilla de brote aislada del cotiledón se transfiere a un medio de elongación de brotes (SE, *por sus siglas en inglés*). El medio SE consta de sales de MS, 28 mg/L de hierro, 38 mg/L de Na₂EDTA, 30 g/L de sacarosa y 0.6 g/L de MES, 50 mg/L de asparagina, 100 mg/L de ácido L-pirolutámico, 0.1 mg/L de IAA, 0.5 mg/L de GA3, 1 mg/L de ribósido de zeatina, 50 mg/L de Timentin™, 200 mg/L de cefotaxima, 50 mg/L de vancomicina, 6 mg/L de glufosinato, y 7 g/L de agar Noble, (pH 5.7). Los cultivos se transfieren a medio SE fresco cada 2 semanas. Los cultivos se dejan crecer en una cámara de cultivo Conviron™ a 24 °C con un fotoperíodo de 18 h a una intensidad lumínica de 80-90 μmol/m²seg.

Enraizamiento. Los brotes elongados que se desarrollaron a partir de la almohadilla de brote del cotiledón se aíslan mediante el corte del brote elongado en la base de la almohadilla del brote del cotiledón, e inmersión del brote elongado en 1 mg/L de IBA (ácido indol-3-butírico) durante 1–3 minutos para promover el enraizamiento. A continuación, los brotes elongados se transfieren a un medio de enraizamiento (sales de MS, vitaminas B5, 28 mg/L de hierro, 38 mg/L de Na₂EDTA, 20 g/L de sacarosa y 0.59 g/L de MES, 50 mg/L de asparagina, 100 mg/L de L-ácido pirolutámico, 7 g/L de agar Noble, pH 5.6) en bandejas Phyta.

Cultivo. Luego del cultivo en una cámara de cultivo Conviron™ a 24 °C, y un fotoperíodo de 18 h, durante 1-2 semanas, los brotes que desarrollaron raíces se transfieren a una mezcla de suelo en una taza de sundae cubierta y se colocan en una cámara de cultivo Conviron™ (modelos CMP4030 y CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) en condiciones de día
5 prolongado (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a una intensidad lumínica de 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{seg}$ a temperatura (22 °C) y humedad (40-50 %) constantes para la aclimatación de las plántulas. Las plántulas enraizadas se aclimatan en tazas de sundae durante varias semanas antes de transferirlas al invernadero para otra aclimatación y el establecimiento de plantas de soja transgénicas robustas.

Se obtienen otras 10-20 líneas T₁ independientes de *Glycine max* que expresan el ARNdh de horquilla
10 para un constructo de iARN para la estimulación del BSB. Puede obtenerse un ARNdh de horquilla que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:102, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103, o sus segmentos (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104-106). Se confirman a través de RT-PCR u otros métodos de análisis molecular conocidos en la técnica. Las preparaciones de ARN total de líneas T₁ independientes seleccionadas se usan
15 opcionalmente para la RT-PCR con cebadores diseñados para unirse en el intrón enlazante del casete de expresión de horquilla en cada uno de los constructos de iARN. Además, se usan opcionalmente cebadores específicos para cada gen objetivo en un constructo de iARN para amplificar y confirmar la producción del ARNm preprocesado requerido para la producción de ARNip *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión del ARN de
20 horquilla en cada planta transgénica de *Glycine max*. El procesamiento de la horquilla de ARNdh de los genes objetivo a ARNip se confirma luego opcionalmente en líneas transgénicas independientes con el uso de hibridaciones con membrana de transferencia de ARN.

Las moléculas de ARNi que tienen secuencias con faltas de coincidencia con más de 80 % de identidad de secuencias respecto a genes objetivo afectan a los BSB de manera similar que la
25 observada con las moléculas de ARNi que tienen 100 % de identidad de secuencias respecto a los genes objetivo. El apareamiento de la secuencia con faltas de coincidencia con secuencias nativas para formar un ARNdh de horquilla en el mismo constructo de iARN proporciona ARNip procesado por la planta capaces de afectar el crecimiento, el desarrollo y la viabilidad de las plagas de hemípteros que se alimentan de ella.

30 La administración *in planta* de ARNdh, ARNip, ARNhp, o miARN correspondientes a genes objetivo y la posterior captación por las plagas de hemípteros a través de la alimentación resulta en la

regulación negativa de los genes objetivo en la plaga de hemípteros a través del silenciamiento génico mediado por ARN. Cuando la función de un gen objetivo es importante en una o más etapas del desarrollo, el crecimiento, el desarrollo, y la viabilidad de la alimentación de la plaga de hemípteros se afectan y, en el caso de al menos uno de *Euschistus heros*, *Piezodorus guildinii*, *Halyomorpha halys*,
5 *Nezara viridula*, *Chinavia hilare*, *Euschistus servus*, *Dichelops melacanthus*, *Dichelops furcatus*,
Edessa mediatubunda, *Thyanta perditor*, *Chinavia marginatum*, *Horcias nobilellus*, *Taedia stigmosa*,
Dysdercus peruvianus, *Neomegalotomus parvus*, *Leptoglossus zonatus*, *Niesthrea sidae*, y *Lygus*
lineolaris conduce a la imposibilidad de infestar, alimentarse y/o desarrollarse exitosamente, y/o a la
muerte de la plaga de hemípteros. La elección de genes objetivo y la aplicación exitosa de la iARN se
10 usa entonces para controlar plagas de hemípteros.

Comparación fenotípica de líneas de iARN transgénicas y *Glycine max* no transformada. Los genes o las secuencias de plagas de hemípteros objetivo seleccionados para crear ARNdh de horquilla no tienen similitud con ninguna secuencia de genes vegetales conocida. Por ende, no se espera que la producción o activación de la iARN (sistémica) por los constructos dirigidos a estos genes o
15 secuencias de plagas de hemípteros tengan un efecto perjudicial en las plantas transgénicas. Sin embargo, las características de desarrollo y morfológicas de las líneas transgénicas se comparan con las de plantas no transformadas, así como también con las de aquellas líneas transgénicas transformadas con un vector "vacío" que no tienen ningún gen que exprese la horquilla. Se comparan las características de las raíces, brotes, follaje y reproducción de las plantas. No existe diferencia
20 observable en los patrones de crecimiento y longitud de las raíces de plantas transgénicas y no transformadas. Las características de los brotes de las plantas como, por ejemplo, altura, cantidad y tamaño de las hojas, momento de la floración, tamaño y apariencia de las flores son similares. En general, no existen diferencias morfológicas observables entre las líneas transgénicas y aquellas sin expresión de moléculas de ARNi objetivo cuando se cultivan *in vitro* y en el suelo en el invernadero.

25 Ejemplo 15: Bioensayos de *E. heros* con una dieta artificial

En los ensayos de alimentación de ARNdh con una dieta artificial, se colocan bandejas de 32 pocillos con una torta de ~18 mg de dieta artificial y agua, como para experimentos de inyección (véase el ejemplo 12). Se agrega ARNdh a una concentración de 200 ng/μL a la muestra de torta alimenticia y agua; 100 μL a cada uno de dos pocillos. Se introducen cinco ninfas de *E. heros* de segundo instar en
30 cada pocillo. Las muestras de agua y el ARNdh dirigido a un transcrito de *YFP* se usan como controles negativos. Los experimentos se repiten en tres días diferentes. Se procede a tomar el peso de

los insectos sobrevivientes, y se determinan las tasas de mortalidad luego de 8 días de tratamiento. Se observa la mortalidad y/o la inhibición del crecimiento en los pocillos provistos de ARNdh de *rpII215* de BSB, en comparación con los pocillos de control.

Ejemplo 16: *Arabidopsis thaliana* transgénica que comprende secuencias de plagas de hemípteros

- 5 Se generan vectores de transformación de *Arabidopsis* que contienen un constructo de genes objetivo para la formación de horquilla que comprende segmentos de *rpII215* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, y/o 81) con el uso de métodos moleculares estándar similares a los del EJEMPLO 4. La transformación de *Arabidopsis* se realiza con el uso de un procedimiento estándar basado en *Agrobacterium*. Se seleccionan semillas T₁ con un marcador de selección de tolerancia al glufosinato.
- 10 Se generan plantas transgénicas T₁ de *Arabidopsis* y se generan plantas transgénicas T₂ homocigotas de copia simple para los estudios de insectos. Se realizan bioensayos en plantas de *Arabidopsis* en cultivo con inflorescencias. Se colocan de cinco a diez insectos en cada planta y se monitorean para determinar la supervivencia dentro de un período de 14 días.

- Construcción de vectores de transformación de *Arabidopsis*. Se ensamblan clones de entrada en base a
- 15 un vector de entrada que aloja un constructo de gen objetivo para la formación de horquilla que comprende un segmento de *rpII215* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77, 79, y/o 81) con el uso de una combinación de fragmentos químicamente sintetizados (DNA2.0, Menlo Park, CA) y métodos estándar de clonación molecular. La formación de la horquilla intramolecular por transcritos primarios de ARN se facilita mediante la disposición (dentro de una única unidad de transcripción) de dos
 - 20 copias de un segmento de gen objetivo en orientaciones opuestas, donde los dos segmentos se separan mediante una secuencia enlazante (por ejemplo, intrón ST-LS1) (Vancanneyt *et al.* (1990) Mol. Gen. Genet. 220(2):245-50). De este modo, el transcrito primario de ARNm contiene las dos secuencias de los segmentos del gen *rpII215* como repeticiones invertidas grandes respecto una de la otra, separadas por la secuencia enlazante. Una copia de un promotor (por ejemplo, el promotor de ubiquitina 10 de
 - 25 *Arabidopsis thaliana* (Callis *et al.* (1990) J. Biological Chem. 265:12486-12493)) se usa para conducir la producción del transcrito primario de ARNm de horquilla, y se usa un fragmento que comprende una región no traducida 3' de un marco abierto de lectura 23 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3'UTR v1; Patente de los Estados Unidos 5,428,147) para terminar la transcripción del gen que expresa el ARN de horquilla.

- 30 Los clones de horquilla dentro de los vectores de entrada se usan en reacciones de recombinación estándar GATEWAY[®] con un vector de destino binario típico para producir vectores de

transformación de expresión de ARN de horquilla para la transformación de *Arabidopsis* mediada por *Agrobacterium*.

Un vector de destino binario comprende un gen de tolerancia a herbicidas, *DSM-2v2* (Publicación de patente de los Estados Unidos núm. 2011/0107455), bajo la regulación de un promotor v2 del virus del mosaico de la nervadura de la yuca (CsVMV v2, Patente de los Estados Unidos 7,601,885; Verdaguer *et al.* (1996) Plant Mol. Biol. 31:1129-39). Se usan un fragmento que comprende una región no traducida 3' de un marco abierto de lectura 1 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3'UTR v6; Huang *et al.* (1990) J. Bacteriol. 172:1814-22) para terminar la transcripción del ARNm de DSM2v2.

Un constructo binario de control negativo que comprende un gen que expresa un ARN de horquilla de *YFP*, se construye por medio de reacciones de recombinación estándar GATEWAY[®] con un vector de destino binario típico y un vector de entrada. El constructo de entrada comprende una secuencia de horquilla de *YFP* bajo el control de la expresión de un promotor de ubiquitina 10 de *Arabidopsis* (como se mencionó anteriormente) y un fragmento que comprende una región no traducida 3' del ORF 23 de *Agrobacterium tumefaciens* (como se mencionó anteriormente).

Producción de *Arabidopsis* transgénica que comprende ARN insecticidas: transformación mediada por *Agrobacterium*.

Los plásmidos binarios que contienen secuencias de ARNdh de horquilla se someten a electroporación en una cepa GV3101 de *Agrobacterium* (pMP90RK). Los clones de *Agrobacterium* recombinantes se confirman mediante un análisis de restricción de preparaciones de plásmidos de las colonias de *Agrobacterium* recombinante. Se usa un estuche Qiagen Plasmid Max (Qiagen, núm. de Catálogo 12162) para extraer plásmidos de cultivos de *Agrobacterium* de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante.

Transformación de *Arabidopsis* y selección de T₁. Se cultivan de doce a quince plantas de *Arabidopsis* (c.v. Columbia) en macetas de 4" en el invernadero con una intensidad lumínica de 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 25 °C, y 18:6 horas de condiciones de luz:oscuridad. Se recortan los tallos primarios de las flores una semana antes de la transformación. Los inóculos de *Agrobacterium* se preparan mediante la incubación de 10 μL de reserva en glicerol de *Agrobacterium* recombinante en 100 mL de caldo LB (Sigma L3022) +100 mg/L de espectinomicina + 50 mg/L de Kanamicina a 28 °C y agitación a 225 rpm durante 72 horas. Las células de *Agrobacterium* se cosechan y suspenden en 5 % de sacarosa + 0.04 % de Silwet-L77 (semillas Lehle núm. de Catálogo VIS-02) +10 $\mu\text{g}/\text{L}$ de solución de benzamino

purina (BA) a una DO_{600} de 0.8~1.0 antes de la inmersión floral. Las partes de la planta sobre la tierra se sumergen en la solución de *Agrobacterium* durante 5-10 minutos, con agitación suave. Las plantas se transfieren luego al invernadero para el cultivo normal con riego regular y fertilización hasta la generación de semillas.

5 Ejemplo 17: Cultivo y bioensayos de *Arabidopsis* transgénica

Selección de *Arabidopsis* T₁ transformada con constructos de ARNdh. Se estratifican hasta 200 mg de semillas T₁ de cada transformación en una solución de agarosa al 0.1 %. Las semillas se siembran en bandejas de germinación (10.5" x 21" x 1"; T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN.) con medio sunshine #5. Los transformantes se seleccionan para determinar la tolerancia a Ignite[®] (glufosinato) a 280 g/ha a los 6 y 9 días luego de la siembra. Los eventos seleccionados se trasplantan a macetas de 4" de diámetro. Se realiza un análisis de copias de inserción dentro un período de una semana del trasplante por medio de una PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) de hidrólisis con el uso de un instrumento LightCycler480™ de Roche. Los cebadores de PCR y las sondas de hidrólisis se diseñan contra el marcador de selección DSM2v2 con el uso del software de diseño de sondas LightCycler™ 2.0 (Roche). Las plantas se mantienen a 24 °C, con un fotoperíodo de 16:8 horas de luz:oscuridad bajo luces fluorescentes e incandescentes a una intensidad de 100-150 mE/m²s.

Bioensayo de alimentación de *E. heros* en plantas.

Se seleccionan al menos cuatro eventos de bajo número de copias (1-2 inserciones), cuatro de número de copias intermedio (2-3 inserciones), y cuatro de alto número de copias (≥ 4 inserciones) para cada constructo. Las plantas se cultivan hasta una etapa reproductiva (plantas que contienen flores y silicuas). La superficie del suelo se cubre con un volumen de ~ 50 mL de arena blanca para una fácil identificación de los insectos. Se introducen de cinco a diez ninfas de *E. heros* de segundo instar en cada planta. Las plantas se cubren con tubos de plástico de un diámetro de 3", una altura de 16", y con un grosor de pared de 0.03" (Ítem núm. 484485, Visipack Fenton MO); los tubos se cubren con una malla de nailon para aislar los insectos. Las plantas se mantienen bajo condiciones normales de temperatura, luz y riego en una conviron. En 14 días, se recogen los insectos y se toma el peso de los insectos. Se calculan el porcentaje de la mortalidad así como también la inhibición del crecimiento (1 – peso con tratamiento/peso del control). Se usan plantas que expresan la horquilla de YFP como controles.

30 Generación de semillas T₂ de *Arabidopsis* y bioensayos de T₂. Se producen semillas T₂ a partir de eventos de bajo número de copias seleccionados (1-2 inserciones) para cada constructo. Las plantas

(homocigotas y/o heterocigotas) se someten a un bioensayo de alimentación de *E. heros* como se describió anteriormente. La semilla T₃ se cosecha de las homocigotas y se almacenan para un futuro análisis.

Ejemplo 18: Transformación de especies de cultivo adicionales

- 5 Se transforma algodón con un transgen de ARNdh de *rpII215* a los efectos de proporcionar el control de insectos de hemípteros mediante el uso de un método conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, sustancialmente las mismas técnicas descritas anteriormente en el EJEMPLO 14 de la patente de los Estados Unidos 7,838,733, o en el EJEMPLO 12 de la publicación de patente internacional PCT núm. WO 2007/053482.

10 Ejemplo 19: ARNdh de *rpII215* en el manejo de insectos

- Se combinan transgenes de ARNdh de *RpII215* con otras moléculas de ARNdh en plantas transgénicas para proporcionar efectos de iARN sinérgicos y direccionamiento de la iARN redundante. Las plantas transgénicas que incluyen, por ejemplo, en forma no taxativa, maíz, soja, y algodón que expresan el ARNdh dirigido al *rpII215* son útiles para evitar el daño producido por la alimentación de insectos coleópteros y hemípteros. Los transgenes de ARNdh de *RpII215* se combinan también en plantas con la tecnología de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*, y/o polipéptidos insecticidas PIP-1, para representar nuevos modos de acción en pirámides génicas para el control de la resistencia de los insectos. Cuando se combinan con otras moléculas de ARNdh dirigidas a plagas de insectos y/o con proteínas insecticidas en plantas transgénicas, se observa un efecto
- 15
- 20 sinérgico insecticida que también reduce el desarrollo de poblaciones de insectos resistentes.

Ejemplo 20: Transcriptoma del escarabajo del polen

- Se recogieron escarabajos del polen larvales y adultos de campos con plantas de colza en floración (Giessen, Alemania). Los escarabajos adultos jóvenes (cada uno por grupo de tratamiento: n = 20; 3 réplicas) se estimularon con una inyección de una mezcla de dos bacterias diferentes (*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*), una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y LPS bacteriano. Los
- 25
- cultivos bacterianos se cultivaron a 37 °C con agitación, y se monitoreó la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀). Las células se cosecharon a una DO₆₀₀ ~1 por centrifugación y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato. La mezcla se introdujo ventrolateralmente pinchando el abdomen de escarabajos del polen imagos con el uso de una jeringa de disección sumergida en una
- 30
- solución acuosa de 10 mg/ml de LPS (endotoxina de *E. coli* purificada; Sigma, Taufkirchen,

Alemania) y los cultivos de bacterias y levadura. Junto con los escarabajos inmunoestimulados se recogieron escarabajos vírgenes y larvas (n = 20 cada 3 réplicas cada uno) en el mismo momento.

El ARN total se extrajo a las 8 h luego de la inmunización a partir de los escarabajos y larvas congelados con el uso de TriReagent (Molecular Research Centre, Cincinnati, OH, Estados Unidos de América) y se purificaron con el uso del estuche RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) en cada caso de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Se verificó la integridad del ARN con el uso de un bioanalizador Agilent 2100 y un estuche RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Estados Unidos de América). La cantidad de ARN se determinó con el uso de un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. El ARN se extrajo individualmente de cada uno de los grupos de tratamiento de adultos inmunoinducidos, grupos de adultos controles, y grupos larvarios y posteriormente se combinaron cantidades iguales del ARN total en un grupo por muestra (adultos inmunoestimulados, adultos controles y larvas) para la secuenciación.

La generación de datos de la secuenciación de ARN y el ensamble de la secuenciación de ARN de lectura única de fragmentos de 100 pb se realizaron en forma separada en 5 µg de ARN total aislado de escarabajos adultos inmunoestimulados, escarabajos adultos vírgenes (control) y larvas no tratadas. La secuenciación se realizó por Eurofins MWG Operon con el uso de la plataforma Illumina HiSeq-2000, que proporcionó 20.8 millones de lecturas para la muestra de escarabajos adultos controles, 21.5 millones de lecturas para la muestra de escarabajos adultos estimulados con LPS y 25.1 millones de lecturas para la muestra de larvas. Las lecturas agrupadas (67.5 millones) se ensamblaron con el uso del software de ensamble *Velvet/Oases* (Schulz *et al.* (2012) *Bioinformatics* 28:1086-92; Zerbino & Birney (2008) *Genome Research* 18:821-9). El transcriptoma contenía 55,648 secuencias.

Se usó una búsqueda *tblastn* del transcriptoma para identificar los cóntigos coincidentes (es decir, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107). Como consulta se usó la secuencia peptídica de *rpII215* de *Tribolium castaneum* (Genbank XP_969020.2).

Ejemplo 21: Mortalidad de *Meligethes aeneus* luego del tratamiento con la iARN de *rpII215*

Se usaron cebadores específicos de genes que incluían la secuencia promotora de polimerasa T7 en el extremo 5' para crear productos de PCR de aproximadamente 500 pb por PCR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:117). Se clonaron fragmentos de PCR en el vector pGEM T Easy de acuerdo con el protocolo del fabricante y se enviaron a una empresa de secuenciación para verificar la secuencia. El ARNdh se produjo luego mediante la ARN polimerasa T7 (MEGAscript® RNAi Kit, Applied Biosystems) a

partir de un constructo de PCR generado a partir del plásmido secuenciado de acuerdo con el protocolo del fabricante.

La inyección de ~100 nL de ARNdh (1 µg/µL) en escarabajos adultos se realizó con un micromanipulador bajo un estereomicroscopio de disección (n=10, 3 réplicas biológicas). Los animales se anestesiaron sobre hielo antes de fijarlos a una cinta de doble adherencia. Los controles recibieron el mismo volumen de agua. Se procesó el ARNdh de IMPI (gen inhibidor de la metaloproteínasa de insecto del lepidóptero *Galleria mellonella*) como control negativo.

Los escarabajos del polen se mantuvieron en placas Petri con polen seco y un tejido húmedo.

Tabla 14. Resultados de la inyección de adultos de *M. aeneus* con ARNdh de *rpII215* (Porcentaje de supervivencia media ± std, n= 3 grupos de 10).

Tratamiento	% de supervivencia media ± SD*				
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
<i>rpII215</i>	100 ± 0	100 ± 0	73 ± 21	47 ± 5,8	13 ± 5.8
control	100 ± 0	93 ± 12	93 ± 12	83 ± 15	83 ± 15
	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16	
<i>rpII215</i>	6.7 ± 5.8	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
control	77 ± 5.8	77 ± 5.8	37 ± 5.8	33 ± 5.8	

*Desviación estándar

Tabla 17. Resultados de la inyección de adultos de *M. aeneus* con ARNdh de *rpII215* (Porcentaje de supervivencia media ± std, n= 3 grupos de 10).

Tratamiento	% de supervivencia media ± SD*				
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
<i>rpII215</i>	100 ± 0	100 ± 0	97 ± 5,8	90 ± 10	73 ± 15
control	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	93 ± 6
	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16	
<i>rpII215</i>	47 ± 12	33 ± 15	23 ± 15	17 ± 15	
control	83 ± 12	77 ± 15	67 ± 21	67 ± 21	

*Desviación estándar

Los controles se realizaron en una fecha diferente debido a la limitada disponibilidad de insectos.

Bioensayo de alimentación: Se mantuvieron escarabajos sin acceso al agua en tubos falcon vacíos 24 h antes del tratamiento. Se colocó una gota de ARNdh (~5µl) en una placa Petri pequeña y se agregaron 5 a 8 escarabajos a la placa Petri. Los animales se observaron bajo un estereomicroscopio y aquellos que ingirieron la solución de dieta que contenía el ARNdh se seleccionaron para el bioensayo. Los escarabajos se transfirieron a placas Petri con polen seco y un tejido húmedo. Los controles recibieron el mismo volumen de agua. Se procesó el ARNdh de IMPI (gen inhibidor de la metaloproteinasa de insecto del lepidóptero *Galleria mellonella*) como control negativo. Todos los controles en todas las etapas no pudieron someterse a prueba debido a la carencia de animales.

Tabla 18. Resultados de la alimentación de adultos de *M. aeneus* con ARNdh de *rpII215* (Porcentaje de supervivencia media $\pm$ std, n= 3 grupos de 10).

Tratamiento	% de supervivencia media $\pm$ SD*				
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
<i>rpII215</i>	100 $\pm$ 0	97 $\pm$ 6	97 $\pm$ 6	97 $\pm$ 6	93 $\pm$ 6
Control	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16	
<i>rpII215</i>	50 $\pm$ 10	43 $\pm$ 12	30 $\pm$ 17	30 $\pm$ 17	
Control	80 $\pm$ 10	70 $\pm$ 20	63 $\pm$ 25	63 $\pm$ 25	

Tabla 19. Resultados de la alimentación de adultos de *M. aeneus* con ARNdh de *rpII215* (Porcentaje de supervivencia media $\pm$ std, n= 3 grupos de 10).

Tratamiento	% de supervivencia media $\pm$ SD*				
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
<i>rpII215</i>	100 $\pm$ 0	97 $\pm$ 6	87 $\pm$ 23	87 $\pm$ 23	87 $\pm$ 23
Control	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	90 $\pm$ 10	87 $\pm$ 15
	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16	
<i>rpII215</i>	83 $\pm$ 21	73 $\pm$ 15	70 $\pm$ 10	67 $\pm$ 12	
Control	80 $\pm$ 20	80 $\pm$ 20	73 $\pm$ 15	73 $\pm$ 15	

* Desviación estándar

Los controles se realizaron en una fecha diferente debido a la disponibilidad limitada de insectos.

Ejemplo 21: Transformación mediada por *Agrobacterium* de hipocótilos de Canola (*Brassica napus*)

Preparación de *Agrobacterium*

La cepa de *Agrobacterium* que contenía al plásmido binario se siembra por estrías en placas con medio YFP (Bacto Peptone™ 20.0 g/L y extracto de levadura 10.0 g/L) que contenían estreptomicina (100 mg/ml) y espectinomicina (50 mg/mL) y se incubaron durante 2 días a 28 °C. La cepa propagada de *Agrobacterium* que contenía el plásmido binario se raspa de la placa estriada de 2 días con el uso de un asa de inoculación estéril. La cepa de *Agrobacterium* estriada que contiene al plásmido binario se inocular luego en 150 mL de YEP modificado líquido con estreptomicina (100 mg/ml) y espectinomicina (50 mg/ml) en matraces estériles de 500 mL con deflectores y se agita a 200 rpm a 28 °C. Los cultivos se centrifugaron y se resuspendieron en medio M (sales de LS, 3 % de glucosa, vitaminas B5 modificadas, 1 µM de kinetina, 1 µM de 2,4-D, pH 5.8) y se diluyeron hasta alcanzar una densidad adecuada (50 unidades Klett de acuerdo con la medición realizada con el uso de un espectrofotómetro) antes de la transformación de los hipocótilos de canola.

Transformación de canola

Germinación de semillas: Se esterilizan semillas de canola (var. Nexera 710™) en su superficie en 10 % de Clorox™ durante 10 minutos y se enjuagan tres veces con agua destilada estéril (las semillas se hallan en coladores de acero durante este proceso). Las semillas se siembran para su germinación en medio ½ MS de canola (1/2 MS, 2 % de sacarosa, 0.8 % de agar) contenido en bandejas Phytatrays™ (25 semillas por Phytatray™) y se colocan en una cámara de cultivo Percival™ con un régimen de cultivo establecido a 25°C, un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 5 días de germinación.

Pretratamiento: El día 5, se escinden asépticamente segmentos de hipocótilo de aproximadamente 3 mm de longitud y las secciones restantes de raíces y brotes se desechan (se evita que los segmentos de hipocótilo se sequen mediante la inmersión de los segmentos de hipocótilo en 10 mL de agua milliQ™ estéril durante el proceso de escisión). Los segmentos de hipocótilo se colocan horizontalmente en un papel de filtro estéril sobre medio inductor de callos, MSK1D1 (MS, 1 mg/L de kinetina, 1 mg/L de 2,4-D, 3.0 % de sacarosa, 0.7 % fitoagar) durante 3 días antes del tratamiento en una cámara de crecimiento Percival™ con un régimen de cultivo establecido a 22-23°C y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Cocultivo con Agrobacterium: El día antes del cocultivo con *Agrobacterium*, los matraces de medio YEP que contienen los antibióticos adecuados, se inoculan con la cepa de *Agrobacterium* que contiene al plásmido binario. Los segmentos de hipocótilo se transfieren desde el papel de filtro sobre el medio de inducción de callos, MSK1D1 a placas Petri™ vacías de 100 x 25 mm que contienen 10 mL de medio M líquido para evitar que se sequen los segmentos de hipocótilo. Se usa una espátula en esta etapa para extraer los segmentos y transferirlos a medio nuevo. El medio M líquido se retira con una pipeta y se agregan 40 mL de una suspensión de *Agrobacterium* a la placa Petri™ (500 segmentos con 40 mL de solución de *Agrobacterium*). Los segmentos de hipocótilo se tratan durante 30 minutos con arremolinado periódico de la placa Petri™ de manera que los segmentos de hipocótilo permanezcan inmersos en la solución de *Agrobacterium*. Al final del período de tratamiento, la solución de *Agrobacterium* se coloca con una pipeta en un vaso de precipitados de residuos; se esteriliza en autoclave y se desecha (la solución de *Agrobacterium* se retira completamente para evitar el exceso de crecimiento de *Agrobacterium*). Los hipocótilos tratados se transfieren con pinzas de regreso a las placas originales que contienen el medio MSK1D1 cubierto con papel de filtro (debe tomarse cuidado de asegurarse que los segmentos no se sequen). Los segmentos de hipocótilo transformados y los segmentos de hipocótilo de control no transformados se regresan a la cámara de cultivo Percival™ bajo una intensidad lumínica reducida (cubriendo las placas con una hoja de aluminio), y los segmentos de hipocótilo tratados se cocultivan con *Agrobacterium* durante 3 días.

Inducción de callos en medio de selección: Luego de 3 días de cocultivo, los segmentos de hipocótilo se transfieren individualmente con pinzas a medio de inducción de callos, MSK1D1H1 (MS, 1 mg/L de kinetina, 1 mg/L de 2,4-D, 0.5 g/L de MES, 5 mg/L de AgNO₃, 300 mg/L de Timentin™, 200 mg/L de carbenicilina, 1 mg/L de Herbiace™, 3 % de sacarosa, 0.7 % de fitoagar) con un régimen de cultivo establecido a 22-26 °C. Los segmentos de hipocótilo se anclan en el medio pero no se embeben profundamente en el medio.

Selección y regeneración de brotes: Luego de 7 días en medio de inducción de callos, los segmentos de hipocótilo en formación de callos se transfieren a medio de regeneración de brotes 1 con selección, MSB3Z1H1 (MS, 3 mg/L de BAP, 1 mg/L de zeatina, 0.5 g/L de MES, 5 mg/L de AgNO₃, 300 mg/L de Timentin™, 200 mg/L de carbenicilina, 1 mg/L de Herbiace™, 3 % de sacarosa, 0.7 % de fitoagar). Luego de 14 días, los segmentos de hipocótilo que desarrollan brotes se transfieren a medio de regeneración 2 con una selección incrementada, MSB3Z1H3 (MS, 3 mg/L de BAP, 1 mg/L de Zeatina, 0.5 g/L de MES, 5 mg/L de AgNO₃, 300 mg/L de Timentin™, 200 mg/L de carbenicilina, 3

mg/L de Herbiace™, 3 % de sacarosa, 0.7 % de fitoagar) con un régimen de cultivo establecido a 22-26 °C.

Elongación de brotes: Luego de 14 días, los segmentos de hipocótilo que desarrollan brotes se transfieren desde el medio de regeneración 2 a medio de elongación de brotes, MSMESH5 (MS, 300 mg/L de Timentin™, 5 mg/l de Herbiace™, 2 % de sacarosa, 0.7 % de TC Agar) con un régimen de cultivo establecido a 22-26 °C. Los brotes que ya se elongaron se aíslan de los segmentos de hipocótilo y se transfieren a MSMESH5. Luego de 14 días, los brotes restantes que no se elongaron en la primera ronda de cultivo en el medio de elongación de brotes se transfieren a medio de elongación de brotes fresco, MSMESH5. En esta etapa todos los segmentos de hipocótilo restantes que no producen brotes se desechan.

Inducción de raíces: Luego de 14 días de cultivo en el medio de elongación de brotes, los brotes aislados se transfieren a medio MSMEST (MS, 0.5 g/L de MES, 300 mg/L de Timentin™, 2 % de sacarosa, 0.7 % de TC Agar) para la inducción de las raíces a 22-26 °C. Todo brote que no produce raíces luego de la incubación en la primera transferencia al medio MSMEST se transfiere a una segunda o tercera ronda de incubación en medio MSMEST hasta que los brotes desarrollan raíces.

Aunque la presente descripción puede ser susceptible a diversas modificaciones y formas alternativas, en la presente se han descrito en detalle modalidades específicas a modo de ejemplo. Sin embargo, debe entenderse que la presente descripción no pretende limitarse a las formas particulares descritas. En lugar de esto, la presente descripción abarca todas las modificaciones, equivalentes, y alternativas incluidas dentro del alcance de la presente descripción de acuerdo a lo definido en las reivindicaciones anexas a continuación y sus equivalentes legales.