

MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO DE ARN POLIMERASA II33 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 de invención provisional de los Estados Unidos, número de serie 62/133.210, presentada el 13 de marzo de 2015, para “RNA POLYMERASE II33 NUCLEIC ACID MOLECULES TO CONTROL INSECT PESTS”.

10 CAMPO TÉCNICO

- La presente invención se refiere en general al control genético del daño en vegetales ocasionado por las plagas de insectos (por ejemplo, plagas de coleópteros y plagas de hemípteros). En las 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 la
- 15 represión postranscripción o inhibición de 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

- 20 El gusano de la raíz del maíz occidental (WCR, *por sus siglas en inglés*), *Diabrotica virgifera 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 mediooeste 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
- 25 parte del mismo rango que el WCR. Existen otras varias subespecies relacionadas de *Diabrotica* que 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
- 30 Unidos estimó que los gusanos de la raíz del maíz causan pérdidas anuales en los ingresos que ascienden a mil millones de Dólares Estadounidenses, que incluyen 800 millones de Dólares

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

Los huevos del WCR y del 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 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 nacen más tarde y tienen un tamaño de cápsula de cabeza más pequeño como adultos que las larvas que se crían en maíz. Ellsbury *et al.* (2005) Environ. Entomol. 34:627-34. Los WCR adultos se alimentan de los estigmas, polen, y granos del maíz en las puntas expuestas de las espigas. Si los WCR adultos nacen 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 las hebras 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 frecuentemente en la caída de las plantas de maíz, por lo que la cosecha se torna más difícil y disminuye más aún el rendimiento. Asimismo, 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 interrumpida.

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 de *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. Más aún, la oviposición de algunas especies de gusanos de la raíz puede 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 mil millones de Dólares Estadounidenses pueden 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 densas lluvias y la aplicación inadecuada de los insecticidas pueden resultar todas ellas en el control inadecuada del gusano de la raíz del maíz. Más aún, el uso continuo de insecticidas puede seleccionar para cepas de gusano de la raíz resistente a insecticidas, así como plantear cuestiones ambientales significativas debido a la toxicidad para las especies no objetivo.

Las chinches y otros insectos hemípteros (heterópteros) constituyen otro complejo importante de plaga agrícola. Se conocen en el mundo más de 50 especies estrechamente relacionadas de chinches que causan daños a los cultivos. McPherson & McPherson (2000) Stink bugs of economic importance in America north of Mexico, [Chinches de importancia económica en el norte de México en América], 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 atraviesan varias etapas de ninfas 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. Entonces, 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 chinches 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 ruta celulares endógenas, por medio de los cuales una molécula de ARN interferente (iARN) (por ejemplo, una molécula de ARNdh) que es específica para la totalidad o una parte de tamaño adecuado de un gen objetivo resulta en la degradación del mRNA codificado de ese modo. En los últimos años, el ARNi se utilizó para realizar una "supresión" génica en varias especies y en sistemas experimentales; por ejemplo, *Caenorhabditis elegans*, vegetales, 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.

El iARN realiza la degradación del ARNm a través de una ruta endógena que incluye el complejo de proteínas DICER. DICER escinde las moléculas de ARNdh largas en fragmentos cortos de aproximadamente 20 nucleótidos, denominados ARN interferentes 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 (miARNs) 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 Argonaute, 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, planta, nemátodos y algunos insectos.

Solamente los transcritos complementarios al ARNip y/o miARN se escinden y degradan y, por ende, la supresión de la expresión del ARNm es específica de la secuencia. En las planta, 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 fijado como 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 Argonaute1. Lee *et al.* (2004) Cell 117 (1):69-81. DICER2 facilita la degradación dirigida por el ARNip mediante Argonaute2.

La patente de invención estadounidense 7,612,194 y las publicaciones de patentes de invención estadounidenses núms. 2007/0050860, 2010/0192265, y 2011/0154545 divulgan una biblioteca de 9112 secuencias de etiquetas de secuencias expresadas (EST, *por sus siglas en inglés*) aisladas de pupas de *D. v. virgifera* LeConte. En la patente de invención estadounidense 7,612,194 y en la publicación de patente de invención estadounidense núm. 2007/0050860 se sugiere 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* divulgada allí para la expresión del ARN antisentido en células vegetales. La publicación de patente de invención estadounidense 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 divulgada (se expresa que la secuencia parcial es 58 % idéntica al producto génico C56C10.3 en *C. elegans*) para la expresión del ARN antisentido en células vegetales. La publicación de patente de invención estadounidense núm. 2011/0154545 sugiere la unión operativa 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 invención estadounidense 7,943,819 describe una biblioteca de 906 secuencias de etiquetas de secuencias expresadas (ESE) aisladas de larvas, pupas e intestinos medios diseccionados de *D. v. virgifera* LeConte, y sugiere la unión operativa un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria de 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 provee ninguna otra sugerencia en la patente de invención estadounidense 7,612,194, y en las publicaciones de patentes de invención estadounidenses núms. 2007/0050860, 2010/0192265, y 2011/0154545 para usar alguna secuencia en particular de más de nueve mil secuencias mencionadas allí para la interferencia porl 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 invención estadounidense 7,612,194 y las publicaciones de patentes de invención estadounidenses núms. 2007/0050860, 2010/0192265, y 2011/0154545 provee 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 utilizan como ARNdh o ARNip. La

Patente de invención estadounidense 7,943,819 no ofrece ninguna sugerencia en cuanto a usar cualquier secuencia en particular de las más de novecientas secuencias allí mencionadas para la interferencia por ARN, que no sea la secuencia parcial particular de un gen de proteína 4b del cuerpo multivesicular cargado. Más aún, la patente de invención estadounidense 7,943,819 no provee 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 utilizan como ARNdh o ARNip. La publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2013/040173 y la publicación de solicitud del PCT núm. WO 2013/169923 describen el uso de una secuencia derivada de un gen Snf7 de *Diabrotica virgifera* para la interferencia del ARN en el maíz. (También 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 mencionadas 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 objetivos de WCR mediante el 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 invención estadounidense 7,612,194 y la publicación de patente de invención estadounidense núm. 2007/0050860 confeccionaron el primer informe de la iARN *in planta* en plantas de maíz que tiene como objetivo al gusano de la raíz del maíz occidental. Baum *et al.* (2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-6. Estos autores describen un sistema de ARNi dietético *in vivo* de alto rendimiento para cribar genes objetivo potenciales para desarrollar maíz de ARNi transgénico. De una colección inicial de genes de 290 objetivos, solamente 14 presentaron potencial de control larvario. Uno de los ARN de doble hebra más efectivo (ARNdh) apuntaba a un gen que codificaba la subunidad A de la ATPasa vacuolar (V-ATPasa), y resultó en una rápida supresión del ARNm endógeno correspondiente y activó una respuesta de la iARN específica con bajas concentraciones de ARNdh. De este modo, estos autores documentaron por primera vez el potencial para el ARNi *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*, aún 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; y *D. speciosa* Germar, y plagas de hemípteros, como, por ejemplo, *Euschistus heros* (Fabr.) (chinche marrón neotropical, "BSB"); *E. servus* (Say) (chinche marrón); *Nezara viridula* (L.) (chinche verde del sur); *Piezodorus guildinii* (Westwood) (chinche de la alfalfa); *Halyomorpha halys* (Stål) (chinche marrón marmolada); *Chinavia hilare* (Say) (chinche verde); *C. marginatum* (Palisot de Beauvois); *Dichelops melacanthus* (Dallas); *D. furcatus* (F.); *Edessa mediatunda* (F.); *Thyanta perditor* (F.) (chinche de hombros rojos neotropical); *Horcias nobilellus* (Berg) (chinche del algodón); *Taedia stigmata* (Berg); *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Ménéville); *Neomegalotomus parvus* (Westwood); *Leptoglossus zonatus* (Dallas); *Niesthrea sidae* (F.); *Lygus hesperus* (Knight) (chinche opaca de las plantas occidentales); y *L. lineolaris* (Palisot de Beauvois). En los ejemplos particulares, se describen moléculas de ácido nucleico ilustrativos que pueden ser homólogas a al menos 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 y sin limitación: participar en un proceso metabólico o en un 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, la subunidad ARN polimerasa II 33 kD (mencionada en la presente como, por ejemplo, *rpII33*) o un homólogo de *rpII33* puede seleccionarse como gen objetivo para el silenciamiento transcripcional. En los ejemplos particulares, un gen objetivo útil para la inhibición postranscripcional es un gen de ARN polimerasa II33 que es el gen mencionado en la presente como *rpII33-1* de *Diabrotica virgifera* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1), *rpII33-2* de *D. virgifera* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3), el gen mencionado en la presente como *rpII33-1* de *Euschistus heros* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76), o *rpII33-2* de *E. heros* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78). Por lo tanto, se

describen en la presente una molécula de ácido nucleico aislado 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.:76; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78; y/o los fragmentos de cualquiera de los mencionados anteriormente (por ejemplo, SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8 y SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82).

Se describen también en la presente moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica un 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 *rpII33*). 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 (RPII33-1 de *D. virgifera*), SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4 (RPII33-2 de *D. virgifera*), SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77 (RPII33-1 de *E. heros*), o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79 (RPII33-2 de *E. heros*); y/o una secuencia de aminoácidos dentro de un producto de *rpII33-1* de *D. virgifera*, *rpII33-2* de *D. virgifera*, *rpII33-1* de *E. heros*, o *rpII33-2* de *E. heros*. Se describen además moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que es un 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 iARN (por ejemplo, ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y ARNhorq) que son complementarias de la totalidad o parte de un gen objetivo de una plaga de insectos, por ejemplo, un gen *rpII33*. En las modalidades particulares, ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y/o ARNhorq pueden producirse *in vitro* o *in vivo*, por un organismo genéticamente modificado, como, por ejemplo, un vegetal o una bacteria. En los ejemplos particulares, se describen moléculas de ADNc que pueden usarse para producir moléculas de iARN que son complementarias de la totalidad o parte de un gen *rpII33* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76; y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78), por ejemplo, un gen *rpII33* de WCR (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3) o un gen *rpII33* de BSB (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78).

Se describen también medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros y medios para proporcionar la protección a un vegetal 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 de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:94-97; 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

5 ARN de una hebra o doble hebra que son sustancialmente homólogas a la totalidad o parte de un gen *rpII33* de coleóptero que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7, y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8. Un medio para proporcionar protección a un vegetal 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

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

Se describen además medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de hemípteros y medios para proporcionar protección a un vegetal 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

15 doble hebra que consiste en un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:100-102 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 *rpII33* de hemípteros que consiste en las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:80, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81,

20 y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:82. Un medio para proporcionar protección a un vegetal 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, donde la molécula de ADN es capaz de ser integrada en el genoma de una planta.

Se describen métodos para controlar una población de una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga

25 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 captada 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

30 comprende proporcionar a la plaga de coleópteros una molécula de iARN que comprende la totalidad o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:92; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:92; SEC. CON NÚM. DE

IDENT.:93; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:94; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:94; 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; un polinucleótido que hibrida a un polinucleótido de *rpII33* nativo de una plaga de coleópteros (por ejemplo, WCR); el complemento de un polinucleótido que hibrida a un polinucleótido de *rpII33* nativo de una plaga de coleópteros; un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificador nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, y 5-8; y el complemento de un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificador nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, y 5-8.

En algunas 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.: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.: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; un polinucleótido que hibrida a un polinucleótido de *rpII33* nativo de una plaga de hemípteros (por ejemplo, BSB); el complemento de un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido de *rpII33* nativo de una plaga de hemípteros; un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificador nativo de un organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:76, 78, y 80-82; y el complemento de un polinucleótido que hibrida a un polinucleótido codificador nativo de un organismo hemíptero que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:76, 78, y 80-82.

En las modalidades particulares, un ARNi que funciona al ser captado por una plaga de insectos para inhibir una función biológica dentro de la plaga se transcribe desde 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.:76; el

complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78; un polinucleótido codificador nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, y 5-8; el complemento de un polinucleótido codificador nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la totalidad o parte de cualquiera de SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, y 5-8; un polinucleótido codificador nativo de un organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:76, 78, y 80-82; y el complemento de un polinucleótido codificador nativo de un organismo hemíptero que comprende la totalidad o parte de cualquiera de SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:76, 78, y 80-82.

Se describen también métodos en los que pueden 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, ARNhps, miARN, y/o ARNhorq pueden ser ingeridos por la plaga. La ingestión de ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y/o ARNhorq de la invención puede resultar entonces en ARNi 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 los que las moléculas de ácido nucleico que comprenden polinucleótidos ilustrativos útiles para el control parental de plagas de insectos se proveen 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*, BSB, *E. servus*, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, *Halyomorpha halys*, *Chinavia hilare*, *C. marginatum*, *Dichelops melacanthus*, *D. furcatus*, *Edessa meditabunda*, *Thyanta perditor*, *Horcias nobilellus*, *Taedia stigmosa*, *Dysdercus peruvianus*, *Neomegalotomus parvus*, *Leptoglossus zonatus*, *Niesthrea sidae*, *Lygus hesperus*, o *L. lineolaris*.

Lo expuesto precedentemente 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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 incluye una ilustración de una estrategia utilizada para proporcionar ARNdh de una única plantilla de transcripción con un único par de cebadores.

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

5

LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias de ácido nucleico identificadas 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 poseen 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 codifica 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 (MAL) de polinucleótidos que codifican ese polipéptido.

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 son descritos necesariamente por la secuencia primaria, la secuencia complementaria y la secuencia complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos se hallan incluidas por 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 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 cualquiera referencia a la secuencia de ADN que la codifica. En el listado de secuencias que se acompaña:

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 muestra un ADN de *rpII33* de WCR ilustrativo, mencionado en la presente en algunos lugares como *rpII33-1* de WCR:

GCCGATGCCATACATACGCTTAAAACATCGTATCTGCTCAGTTCTTTAATTAACACTGAA
 GAAAATCGAATTATAAAATGCCCTACGCTAACACACCGTCAGTACAAATTTCTGAACTA
 ACCGATGAAAATGTAAAGTTCGTCGTTGAGGACACAGACCTTAGCTTGGCAAACAGTCT
 ACGTCGTGTTTTTCATCGCTGAAACTCCAACCCTAGCAATCGATTGGGTTC AATTCGAAG
 5 CCAACTCCACTGTACTGGCAGATGAATTCCTTGCCCATCGAATTGGCTTGATTCCATTGA
 TTTCCGATGAGGTAGTGGACAGAATCCAAAACACTCGTGAATGTTCATGCTTGGACTTT
 TGCACCGAGTGCAGTGTGGAATTTACATTGGATGTCAAATGCAGCGACGAACATACGCG
 CCACGTTACCACGGCCGATTTAAAGTCCAGTGACGCACGAGTGCTACCAGTTACGTCCA
 GACATCGCGATGACGAGGACAACGAATATGGAGAGACGAACGATGAAATTCTGATCAT
 10 CAAACTGCGCAAAGGTCAAGAGCTGAAGTTGCGAGCATACGCGAAAAAGGGTTTCGGC
 AAGGAACATGCCAAATGGAATCCAACGGCTGGCGTTAGCTTTGAATACGATCCAGTCA
 ATTCGATGAGACATACCCTGTACCCGAAGCCGGACGAATGGCCGAAAAGTGAGCACAC
 CGAACTTGACGATGATCAATACGAAGCTGAATATAACTGGGAGGCTAAGCCGAACAAG
 TTTTTCTTCAACGTTGAGTCGAGTGGTGC ACTTCGACCGGAAAACATTGTGCTGATGGG
 15 AGTCAAAGTTTTTGAAAAACAAATTGTCCAATCTACAGACGCAGTTAAGTCACGAATTGA
 CTACAAACGATGCGCTCGTGATT CAGTAAAAGCAGCGATCCCATTGAATTTCTTCAAAA
 TCTTGTTTTTTTCCTCTAAG

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de
 RPII33 codificado por un ADN de *rpII33* de WCR ejemplar, mencionado en la presente en algunos
 20 lugares como RPII33-1 de WCR:

MPYANTPSVQISELTDENVK FVVEDTDLSLANSLRRVFIAETPTLAIDWVQFEANSTVLADE
 FLAHRIGLIPLISDEVVDRIQNTRECSCLDFCTECSVEFTLDVKCSDEHTRHVTTADLKSSDAR
 VLPVTSRHRDDEDNEYGETNDEILIKLRKGQELKL RAYAKKGFGKEHAKWNPTAGVSFEY
 DPVNSMRHTLYPKPDEWPKSEHTELD DDQYEA EYNWEAKPNKFFFNVESSGALRPENIVL
 25 MGVKVLKNKLSNLQTQLSHELTTNDALVIQ

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3 muestra otro ADN de *rpII33* de WCR ilustrativo, mencionado en
 la presente en algunos lugares como WCR *rpII33*-2:

CGTTGACACTGTTGACAGTGACAGTTGAAATTGAAAACCGGATTAGAGAAGTTTTCTTG
 GAAAGTTGTTTTTTTAAATAACTAACATTAAATAGAAGTTATTTGTTTAAGGGTTTAATA
 30 TGCCATATGCAAATCAGCCATCAGTTCATATAACAGATTTAACAGATGATAATTGCAA
 TTTTATATAGAAGACACTGATTTAAGTGTTGCGAATAGCATTCGCCGCGTCCTTATTGCA
 GAAACTCCTACTCTAGCTATAGACTGGGTAAAATTAGAAGCTAACTCAACTGTTCTCAG

TGATGAATTTTTAGCACACCGAATTGGATTGATACCATTAGTTTCCGATGAAGTTGTACA
 AAGATTACAATATCCTAGGGACTGCGTATGTCTCGATTTTTGTCAAGAATGCAGTGTTG
 AATTTACTTTAGATGTAAAATGTACAGATGATCAAACCTCGACATGTAACAACCTGCCGAT
 TTTAAATCTAGTGATCCACGAGTCATACCAGCTACTTCCAAACATCGTGATGATGAATC
 5 CTCAGAGTATGGTGAAACAGATGAAATTCTTATTATTAACCTGCGAAAGGGTCAAGAGC
 TTAAAGTTAAAGCGTATGCCAAAAAAGGCTTTGGAAAAGAGCATGCCAAATGGAATCC
 TACATGTGGTGTTCCTTTGAATATGATCCTGATAACGCTATGAGACATACATTATTTCC
 TAAACCAGACGAATGGCCTAAAAGTGAATACAGCGAATTAGAAGATGATCAGTATGAA
 GCTCCATATAACTGGGAATTAACCTAATAAATTCTTCTACAATGTGGAGGCTGCTGG
 10 ATTGTTGAAACCAGAAAAATATTGTCATCATGGGTGTAGCTATGTTAAAAGAAAAACTGT
 CAAATTTGCAAACACAACCTCAGCCACGAACTAACACCTGATGTTTTGGCCATTCCAATT
 TAAGAAGTTAATTACAATCATAGGTAGAGTTCATTCAACCACAGTTATACATTTTTTTTA
 TAATAGATAAGTAAGTTTTACACTATAGGAACAATTTTTGACATGTTGACTAAAGATCTT
 GTTCAAATAGACTAGAAATAAAATTTTGAATCCAAAAAAAAAAAAA

15 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de RPII33 de WCR codificado por un ADN de *rpII33* de WCR ilustrativo (es decir, *rpII33-2*):

MPYANQPSVHITDLTDDNCKFYIEDTDLSVANSIRRVLIAETPTLAIDWVKLEANSTVLSDEF
 LAHRIGLIPLVSDEVVQRLQYPRDCVCLDFCQECSVEFTLDVKCTDDQTRHVTTADFKSSDP
 RVIPATSKHRDDESSEYGETDEILIIKLKRGQELKVKAYAKKGFGKEHAKWNPTCGVAFEY
 20 DPDNAMRHTLFPKPDEWPKSEYSELEDDQYEAPYNWELKPNKFFYNVEAAGLLKPENIVIM
 GVAMLKEKLSNLQTQLSHELTPDVLAIP

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5 muestra un ADN de *rpII33* de WCR ilustrativo, mencionado en la presente en algunos lugares como reg1 de *rpII33-1* de WCR (región 1), que se utiliza en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

25 GAATTCCTTGCCCATCGAATTGGCTTGATTCCATTGATTTCCGATGAGGTAGTGGACAGA
 ATCCAAAACACTCGTGAATGTTTCATGCTTGGACTTTTGACACCGAGTGCAGTGTGGAATTT
 ACATTGGATGTCAAATGCAGCGACGAACATACGCGCCACGTTACCACGGCCGATTTAAA
 GTCCAGTGACGCACGAGTGCTACCAGTTACGTCCAGACATCGCGATGACGAGGACAAC
 GAATATGGAGAGACGAACGATGAAATTCTGATCATCAAACCTGCGCAAAGGTCAAGAGC
 30 TGAAGTTGCGAGCATACGCGAAAAAGGGTTTCGGCAAGGAACATGCCAAATGGAATCC
 AACGGCTGGCGTTAGCTTTGAATACGATCCAGTCAATTCGATGAGACATACCCTGTACC

CGAAGCCGGACGAATGGCCGAAAAGTGAGCACACCGAACTTGACGATGATCAATACGA
AGCTGAATATAAC

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6 muestra otro ADN de *rpII33* de WCR ilustrativo, mencionado en la presente en algunos lugares como reg1 de *rpII33-2* de WCR (región 1), que se utiliza en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

GTTCTCAGTGATGAATTTTTAGCACACCGAATTGGATTGATACCATTAGTTTCCGATGAA
GTTGTACAAAGATTACAATATCCTAGGGACTGCGTATGTCTCGATTTTTGTCAAGAATGC
AGTGTGGAATTTACTTTAGATGTAAAATGTACAGATGATCAAACCTCGACATGTAACAAC
TGCCGATTTTAAATCTAGTGATCCACGAGTCATACCAGCTACTTCCAAACATCGTGATG
ATGAATCCTCAGAGTATGGTGAAACAGATGAAATTCTTATTATTAAGTGCAGAAAGGGT
CAAGAGCTTAAAGTTAAAGCGTATGCCAAAAAAGGCTTTGGAAAAGAGCATGCCAAAT
GGAATCCTACATGTGGTGTGCTTTGAATATGATCCTGATAACGCTATGAGACATACA
TTATTTCTTAAACCAGACGAATGGCCTAAAAGTGAATACAGCGAATTAGAAGATGATCA
GTATGAAGCTCCATATAACTGGG

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7 muestra otro ADN de *rpII33* de WCR ilustrativo, mencionado en la presente en algunos lugares como v1 de *rpII33-2* de WCR (versión 1), que se utiliza en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

CTTTAGATGTAAAATGTACAGATGATCAAACCTCGACATGTAACAACTGCCGATTTTAAA
TCTAGTGATCCACGAGTCATACCAGCTACTTCCAAACATCGTGATGATGAATCCTCAGA
GTATGGTGAAACAG

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8 muestra otro ADN de *rpII33* de WCR ilustrativo, mencionado en la presente en algunos lugares como v2 de *rpII33-2* de WCR (versión 2), que se utiliza en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

GCGTATGCCAAAAAAGGCTTTGGAAAAGAGCATGCCAAATGGAATCCTACATGTGGTG
TTGCCTTTGAATATGATCCTGATAACGCTATGAGACATACATTATTTCTTAAACCAGACG
AATGGCC

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9 muestra una secuencia de nucleótidos del promotor de fago T7.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10 muestra un fragmento de una secuencia codificante de *YFP* ilustrativo.

Las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:11-18 muestran cebadores utilizados para amplificar las porciones de secuencias de *rpII-33* de WCR ilustrativos que comprenden la reg1 de *rpII33-1*, la reg1

de *rplI33-2*, la v1 de *rplI33-2*, y la v2 de *rplI33-2*, utilizadas en algunos ejemplos para la producción de ARNdh.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:19 muestra un gen de *YFP* ilustrativo.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:20 muestra una secuencia de ADN de la región 1 de *anexina*.

5 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:21 muestra una secuencia de ADN de la región 2 de *anexina*.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:22 muestra una secuencia de ADN de la región 1 de *beta spectrina* 2.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:23 muestra una secuencia de ADN de la región 2 de *beta spectrina* 2.

10 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:24 muestra una secuencia de ADN de la región 1 de *mtRP-L4*.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:25 muestra una secuencia de ADN de la región 2 de *mtRP-L4*.

Las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.: 26-53 muestran cebadores utilizados para amplificar las regiones génicas de *anexina*, *beta spectrina* 2, *mtRP-L4*, y *YFP* para la síntesis de ARNdh.

15 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:54 muestra una secuencia de ADN de maíz que codifica una proteína tipo TIP41.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:55 muestra la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido de cebadores T20VN.

Las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:56-60 muestran cebadores y sondas utilizadas para los análisis de expresión del transcripto de ARNdh en maíz.

20 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:61 muestra una secuencia de nucleótidos de una parte de una región codificante de *SpecR* utilizada para la detección de la estructura principal del vector binario.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:62 muestra una secuencia de nucleótidos de una región codificante de *AAD1* utilizada para el análisis de la cantidad de copias genómicas.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:63 muestra una secuencia de ADN de un gen de *invertasa* de maíz.

25 Las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:64-72 muestran las secuencias de nucleótidos de oligonucleótidos de ADN utilizadas para determinaciones de la cantidad de copias de genes y la detección de la estructura principal del vector binario.

Las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:73-75 muestran cebadores y sondas utilizadas para los análisis de expresión del transcripto ARNdh de maíz.

30 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 muestra un ADN de *rplI33* de BSB ilustrativo, mencionado en la presente en algunos lugares como *rplI33-1* de BSB:

GTTCGGCTCGGGTGAGTGTTTAAACCAACTACGCATCTTGTTCTCGAACCTTTGCGAACA
 GTGTTACAAATAATGCTCGGTTGGTGTAAGGTACCTTTAGAGCGTGACCCCAACTTC
 TTTTGACTCACCTTGCAGAACTCGATCACTAACAATTACGTGTATATAATCGATTCACT
 ACACGAACGATACATGGTTGTTTAGGTTACATTCATGTTATCTTTAGTAATGAAGTTATT
 5 GAGTTGGCCTAATTGTTGAATGTAGTTAACAGAATGCCTTATGCCAATCAACCTTCTGTT
 CATGTTTCAGATTTAACCGACGACAATGTTAAATTCCAAATAGAAGATACAGAATTAAG
 TGTCGCTAACAGCCTCAGAAGAGTCTTCATAGCTGAAACCCCAACTTTAGCTATTGATT
 GGGTGCAATTGTCTGCAAATTCTACTGTTTTAAGTGATGAATTTATTGCTTCTAGAATCG
 GACTTATTCCTTTAACTTCTGATGCTGCAGTCGAAAAATTAATCTATTCTAGGGACTGTA
 10 ATTGTACTGATTTCTGCCCATCCTGTAGTGTTGAGTTTACTTTAGATGTCAAATGTGTAG
 ATGATCAAACCTAGACATGTGACAACTGCAGATTTAAAGACTGCTGATCCATGTGTAGTT
 CCTGCTACATCTAAAAATAGAGATGCTGATGCCAATGAATATGGTGAATCAGATGATAT
 TTTGATTGTAAATTAAGAAAAGGACAAGAGCTTAAATTGAGGGCCTTTGCTAAGAAAG
 GTTTTGGTAAGGAACATGCTAAGTGGAATCCTACTGCTGGGGTTTGTTTTGAGTATGACC
 15 CTGACAACTCAATGAGGCATACACTGTTTCCAAAACCAGATGAGTGGCCAAAAAGTGA
 ATATACTGAATTAGATGAGGATCAGTATGAAGCTCCATTTAATTGGGAAGCCAAACCTA
 ACAAATTTTTCTTCAATGTTGAAAGTTGTGGATCTTTGCGCCCCGAAAACATAGTATTAA
 AAGGAGTAGAAGTTCTAAAATATAAACTTTCTGATTTATTAATTCAATTGAGTCATGAA
 TCAGCTGGCCAAGTTGATCATATGCCTGTTTAACCAGTTTTTTGTGATAAATTATTATCTG
 20 AAATAATTCAATTATTATATTTATATTAATGTAAAATAAAAAGAAATTTGATAACTGAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAATCTATTGAAAGAATACATTCATTAATACCTTTCTAAAGAAAAA
 TTATTCAATTTAAAATTGTTGCCAAAAAGTATTCAGCATTTTTTTAAAATTCAATCTAGG
 CATATACTACTGTAAATAAATACAAACAATACTTTTCATTTTTGTACTGTTCTAAAAATTG
 T

25 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de
 RPII33 de BSB codificado por un ADN de *rpII33* de BSB (es decir, *rpII33-1* de BSB):

MPYANQPSVHVSDLTDDNVKFQIEDTELSVANSLRRVFIAETPTLAIDWVQLSANSTVLSDE
 FIASRIGLIPLTSDAAVEKLIYSRDCNCTDFCPSCSVEFTLDVKCVDDQTRHVTTADLKTADP
 CVVPATSKNRDADANEYGESDDILIVKLRKGQELKLRAFAKKGFGKEHAKWNPTAGVCFE
 30 YDPDNMSMRHTLFPKPDEWPKSEYTELDEDQYEAPFNWEAKPNKFFNFVESCGLRPENIVL
 KGVEVLKYKLSDLLIQLSHESAGQVDHMPV

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78 muestra un ADN de *rpII33* de BSB ilustrativo, mencionado en la presente en algunos lugares como *rpII33-2* de BSB:

TGTAAAACTTGTTCTTTAAGATCTCAAGACCTTTTATTAGAACATCTACAGGCTTAAGAG
AGCCCTCTACAACCTTCTACGTCCATGTGCACCGTGTCTATTTACAAAGGAGATCTGGTT
5 CTTCCTCCTCAACCATCGGCCAGTCCTTCTTAAGCGTATCTTCTGTCCAGTAGTTTGTGG
ACCTAGTCTTATTGGTTCTATCATACTCGAACCCGACAACAGAGACAGGAGACCACTTG
GCATGCATCCTCCCTATCCCCTTCCTAGCAATACACCTAATTTTCAGGCTTTGATTCTTCC
CAAGTTTTTGCAATTACCGGTGTGCTTTTTATAAAAGTCTCGTCACTGTCAAATTTTATGT
CTTTACAAGTCACGTTAAGGGGGGTCTCTGAGGTGTTGCTAACATCAAGTTCCATCTCTA
10 CGGAACAACGAGAGCAAAGCTCATCACAGTCACACTCTTCTTTATACACAAGCTCTTTC
TTTGAGTACATTGGGATAAGCCCAAGGGACTGTGCCAATACTTCATCGGGGAGGACCGT
GTTGTTTTTGTGATTTCGACGAGATCTATTGCGATAGTAGGTACTTCAGATAAGAGGAT
TCTCCTTAGAGCATTAGCATAGGAGACTGTAATCCCAGTGAGAGTGAATTTGATGTGTT
CGTCGTTTTGTTCGTGAATTGTAATTTTCATGAGAAAGCTGGAGGGCAAAGAAATGAA
15 GTAAATTTAGAAGGGAACACCTGTGAAGTATGATCGACTACG

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79 muestra la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido de *RP1133* de BSB codificado por un ADN de *rpII33* de BSB ilustrativo (es decir, *rpII33-2* de BSB):

MKITHIQNDEHIKFTLTGITVSYANALRRILLSEVPTIAIDLVEIKNNTVLPDEVLAQSLGLIP
MYSKKELVYKEECDCELCRCSVEMELDVSNTSETPLNVTCKDIKFDSDEFIKSTPVIAKL
20 GKNQSLKIRCIARKGIGRMHAKWSPVSVVGFEYDRTNKTRSTNYWTEDTLKKDWPMVEEE
EPDLLCEIDTVHMDVEVVEGSLKPVDVLIKLEILKNKFY

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:80 muestra un ADN de *rpII33* de BSB ilustrativo, mencionado en la presente en algunos lugares como *reg1* (región 1) de *BSB_rpII33-1*, que se utiliza en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

GGTGAATCAGATGATATTTTGATTGTAAATTAAGAAAAGGACAAGAGCTTAAATTGAG
GGCCTTTGCTAAGAAAGGTTTTGGTAAGGAACATGCTAAGTGGAATCCTACTGCTGGGG
TTTGTTTTGAGTATGACCCTGACAACCTCAATGAGGCATACACTGTTTCCAAAACAGAT
GAGTGGCCAAAAAGTGAATATACTGAATTAGATGAGGATCAGTATGAAGCTCCATTTA
ATTGGGAAGCCAAACCTAAC

30 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81 muestra otro ADN de *rpII33* de BSB ilustrativo, mencionado en la presente en algunos lugares como *v1* (versión 1) de *BSB_rpII33-1* de BSB, que se utiliza en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

TTGTTTTGAGTATGACCCTGACAACTCAATGAGGCATACACTGTTTCCAAAACCAGATG
AGTGGCCAAAAAGTGAATATACTGAATTAGATGAGGATCAGTATGAAGCTCC

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:82 muestra otro ADN de *rpII33* de BSB ilustrativo, mencionado en la presente en algunos lugares como reg1 (región 1) de BSB_*rpII33-2*, que se utiliza en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

CGTCGAAATCATCAAAAACAACACGGTCCTCCCCGATGAAGTATTGGCACAGTCCCTTG
GGCTTATCCCAATGTACTCAAAGAAAGAGCTTGTGTATAAAGAAGAGTGTGACTGTGAT
GAGCTTTGCTCTCGTTGTTCCGTAGAGATGGAACCTTGATGTTAGCAACACCTCAGAGAC
CCCCCTTAACGTGACTTGTAAGACATAAAATTTGACAGTGACGAGACTTTTATAAAAA
GCACACCGGTAATTGCAAACTTGGGAAGAATCAAAGCCTGAAAATTAGGTGTATTGCT
AGGAAGGGGATAGGGAGGATGCATGCCAAGTGGTCTCCTGTCTCTGTTGTCTCGGGTTCTGA
GTATGATAGAACCAATAAGACTAGGTCCACAACTACTGGACAG

Las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:83-88 muestran cebadores utilizados para amplificar partes de las secuencias de *rpII-33* de BSB ilustrativos que comprenden la reg1 de *rpII33-1*, la reg1 de *rpII33-2*, y la v1 de *rpII33-1*, utilizadas en algunos ejemplos para la producción de ARNdh.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:89 muestra un ADN v2 de *YFP*, que se utiliza en algunos ejemplos para la producción de la hebra sentido de un ARNdh.

Las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:90 y 91 muestran cebadores utilizados para la amplificación por PCR de la *YFP* v2 de la secuencia de *YFP*, utilizada en algunos ejemplos para la producción de ARNdh.

Las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:92-102 muestran ARNs ilustrativo transcritos a partir de ácidos nucleicos que comprenden polinucleótidos de *rpII33* ilustrativos y sus fragmentos.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103 muestra un ADN ilustrativo que codifica ARNdh de *rpII33-2* v1 de *Diabrotica*; que contiene un polinucleótido de sentido, una secuencia de bucles (en cursiva) y un polinucleótido antisentido (fuente subrayada):

CTTTAGATGTAAAATGTACAGATGATCAAACCTCGACATGTAACAACCTGCCGATTTTAAA
TCTAGTGATCCACGAGTCATACCAGCTACTTCCAAACATCGTGATGATGAATCCTCAGA
GTATGGTGAAACAGGAAGCTAGTACCAGTCATCACGCTGGAGCGCACATATAGGCCCTCCA
TCAGAAAGTCATTGTGTATATCTCTCATAGGGAACGAGCTGCTTGCGTATTTCCCTTCCGTAGT
CAGAGTCATCAATCAGCTGCACCGTGTCGTAAAGCGGGACGTTTCGCAAGCTCGTCCGCGGTA
CTGTTTCACCATACTCTGAGGATTCATCATCACGATGTTTGGAAGTAGCTGGTATGACTC

GTGGATCACTAGATTTAAAATCGGCAGTTGTTACATGTCGAGTTTGATCATCTGTACATT
TTACATCTAAAG

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104 muestra un ADN ilustrativo que codifica el ARNdh de *rpII33-2* v2 de *Diabrotica*; que contiene un polinucleótido sentido, una secuencia de bucle (cursiva), y un polinucleótido antisentido, (fuente subrayada):

GCGTATGCCAAAAAAGGCTTTGGAAAAGAGCATGCCAAATGGAATCCTACATGTGGTG
TTGCCTTTGAATATGATCCTGATAACGCTATGAGACATACATTATTCCTAAACCAGACG
AATGGCCGAAGCTAGTACCAGTCATCACGCTGGAGCGCACATATAGGCCCTCCATCAGAAAG
TCATTGTGTATATCTCTCATAGGGAACGAGCTGCTTGCGTATTTCCCTTCCGTAGTCAGAGTCA
TCAATCAGCTGCACCGTGTCGTAAAGCGGGACGTTTCGCAAGCTCGTCCGCGGTAGGCCATTC
GTCTGGTTTAGGAAATAATGTATGTCTCATAGCGTTATCAGGATCATATTCAAAGGGCAA
CACCACATGTAGGATTCCATTTGGCATGCTCTTTTCCAAAGCCTTTTTTGGCATAACGC

Las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:105-106 muestran sondas utilizadas para el análisis de expresión de ARNdh.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107 muestra una secuencia de nucleótidos de ADN ilustrativo que codifica un bucle interviniente en un ARNdh.

Las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:108-109 muestran ARNdh ilustrativo s transcritos a partir de un ácido nucleico que comprende fragmentos de polinucleótidos de *rpII33-2* ilustrativos.

Las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:110-111 muestran cebadores utilizados para análisis de expresión de transcritos de ARNdh en maíz.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Descripción general de varias modalidades

Desarrollamos una interferencia por ARN (iARN) como herramienta para el control de plagas de 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 ARNi de *ARN polimerasa 33* (*rpII33*) en las plagas de insectos ilustrativas, gusano de la raíz del maíz occidental y chinche marrón neotropical, que ha demostrado tener un fenotipo letal cuando, por ejemplo, se administran moléculas de ARNi mediante ARNdh de *rpII33* ingerido o inyectado. En las modalidades de la presente, la capacidad para administrar ARNdh de *rpII33* 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 *rpII33* con otros objetivos de iARN útiles (por ejemplo, ROP (publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 14/577811), ARNP_{II} (Publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 14/577854), objetivos de iARN de ARN *polimerasa II* ARN_i, de acuerdo con lo descrito en la solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/133214, objetivos de iARN de ARN *polimerasa II215*, de acuerdo con lo descrito en la solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/133202, *ncm* (solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/095487), *Dre4* (solicitud de patente de invención estadounidense núm. 14/705,807), *COPI alpha* (solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/063,199), *COPI beta* (solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/063,203), *COPI gamma* (solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/063.192), y *COPI delta* (solicitud de patente de invención estadounidense 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 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 proveen 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 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 esenciales objetivo para el crecimiento, la supervivencia y/o el desarrollo. En algunas modalidades, la molécula de ARN puede ser capaz de formar moléculas de ARN_{dh}. En algunas modalidades, se proveen métodos para la represión postranscripcional de la expresión o inhibición de un gen objetivo mediante moléculas de ácido nucleico que son complementarias de 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 ARN_{dh}, ARN_{ip}, ARN_{hp}, miARN, y/o ARN_{horq} transcritas de la totalidad o una parte de una molécula de ácido nucleico que es complementaria de 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 ARN_{dh}, ARN_{ip}, ARN_{hp}, miARN y/o ARN_{horq} que es complementario a secuencias codificantes y/o no codificantes de los 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 NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 76, y 78, y sus fragmentos. En algunas modalidades, puede expresarse una molécula de ARNdh estabilizado a partir de estos polinucleótidos, sus fragmentos, o un gen que comprende uno de estos polinucleótidos, para el silenciamiento postranscripcional o la inhibición 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 NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82.

Algunas modalidades comprenden una célula huésped recombinante (por ejemplo, una célula vegetal) que posee en su genoma al menos un ADN recombinante que codifica al menos una molécula de iARN (por ejemplo, ARNdh). En modalidades particulares, puede proporcionarse una o más moléculas de ARNdh codificadas cuando son ingeridas por una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) para silenciar en forma postranscripcional o inhibir la expresión de un gen objetivo en la plaga. El ADN recombinante puede comprender, por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82, fragmentos de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82, y un polinucleótido que consiste en que consiste en una secuencia parcial de un gen que comprende una de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82, y/o sus complementos.

Algunas modalidades comprenden una célula huésped recombinante que posee en su genoma un ADN recombinante que codifica al menos una molécula de iARN (por ejemplo, ARNdh) que comprende la totalidad o parte de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:92, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:98, o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99 (por ejemplo, al menos un polinucleótido seleccionado de un grupo que comprende las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:94-97 y 100-102), o su complemento. Cuando es ingerida por una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), la molécula de iARN puede silenciar o inhibir la expresión de un ADN de *rpII33* objetivo (por ejemplo, un ADN que comprende la totalidad o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82) en la plaga o en la progenie de la plaga, mediante lo cual se produce el cese del crecimiento, desarrollo, viabilidad y/o alimentación de la plaga.

En algunas modalidades, una célula huésped recombinante que posee 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 vegetales

transgénicos que comprenden una célula vegetal transformada. Además de tales vegetales transgénicos, se proveen todas las plantas de progenie de cualquier generación de vegetales transgénicos, semillas transgénicas y productos vegetales transgénicos, cada uno de los cuales comprende ADN recombinante. 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.), y vegetales de la familia *Poaceae*.

Otras 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 posee el vector integrado en su genoma y comprende la molécula de ARNdh codificada por el polinucleótido del vector.

Se describe también una planta transgénica que comprende un vector que posee un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNdh integrada en su genoma, 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 toma 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, raíz) o célula vegetal) de manera que el crecimiento y/o la supervivencia de la plaga se inhibe. Las plantas transgénicas aquí descritos 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 a 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; *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 meditabunda* (F.); *Thyanta perditor* (F.); *Horcias nobilellus* (Berg); *Taedia stigmosa* (Berg); *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Ménéville); *Neomegalotomus parvus* (Westwood); *Leptoglossus zonatus* (Dallas); *Niesthrea sidae* (F.); *Lygus hesperus* (Knight); y *L. lineolaris* (Palisot de Beauvois).

En la presente se describen, además, 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 provee 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, por medio de lo cual ocasiona el ARNi y reduce o elimina el daño de 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 proveen composiciones (por ejemplo, una composición tópica) que comprenden una molécula de iARN (por ejemplo, ARNdh) para usar en plantas, animales y/o el medioambiente de una planta o 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 nutricional 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 resulta 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 eliminar en o sobre cualquier tejido o medioambiente 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 de genética recombinante que presentan características diferentes de las características de los métodos mediados por iARN y composiciones de iARN (por ejemplo, producción recombinante de proteínas en plantas que son dañinos para una plaga de insectos (por ejemplo, toxinas de *Bt* y polipéptidos PIP-1 (Ver la publicación de patente de invención estadounidense núm. US 2014/0007292 A1)), y/o expresión recombinante de otras moléculas de ARNi.

II. Abreviaturas

BSB	chinche marrón neotropical (<i>Euschistus heros</i>)
ARNdh	ácido ribonucleico de doble hebra
ESE	etiqueta de secuencia expresada
IC	inhibición del crecimiento
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información de Biotecnología)
ADNg	ácido desoxirribonucleico genómico
iARN	ácido ribonucleico inhibidor
MAL	Marco abierto de lectura
ARNi	interferencia de ácido ribonucleico
miARN	ácido microrribonucleico
ARNhp	ácido ribonucleico de horquilla pequeña
ARNip	ácido ribonucleico inhibidor pequeño
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)
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa
RISC	Complejo silenciador inducido por ARN
5 SCR	Gusano de la raíz del maíz del sur (<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> Barber)
EEM	Error estándar de la media
YFP	Proteína fluorescente amarilla

III. Términos

En la descripción y las tablas a continuación, se utilizan 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 proveen las siguientes definiciones:

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 una lista que comprende *D. v. virgifera* LeConte (WCR); *D. barberi* Smith y Lawrence (NCR); *D. u. howardi* (SCR); *D. v. zea* (MCR); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; y *D. speciosa* Germar.

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 y sin limitación: 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 remojar 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 un vegetal 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 transgén) 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 a 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 de ARN y en el procesamiento, 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 haberse realizado, 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, northern blot, RT-PCR, western blot, o ensayos 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 Hemípteros, que incluyen, por ejemplo y sin limitación, insectos de las familias Pentatomidae, Miridae, Pyrrhocoridae, Coreidae, Alydidae, y Rhopalidae, que se alimentan de un amplio rango de plantas huéspedes y poseen partes bucales succionadoras o perforadoras. En los ejemplos particulares, una plaga de hemípteros se selecciona de la lista que comprende *Euschistus heros* (Fabr.) (chinche marrón neotropical), *Nezara viridula* (L.) (chinche verde del sur), *Piezodorus guildinii* (Westwood) (chinche de la alfalfa), *Halyomorpha halys* (Stål) (chinche marrón marmolada), *Chinavia hilare* (Say) (chinche verde), *Euschistus servus* (Say) (chinche marrón), *Dichelops melacanthus* (Dallas), *Dichelops furcatus* (F.), *Edessa mediatubunda* (F.), *Thyanta perditor* (F.) (chinche de hombros rojos neotropical), *Chinavia marginatum* (Palisot de Beauvois), *Horcias nobilellus* (Berg) (chinche del algodón), *Taedia stigmosa* (Berg), *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Ménéville), *Neomegalotomus parvus* (Westwood), *Leptoglossus zonatus* (Dallas), *Niesthrea sidae* (F.), *Lygus hesperus* (Knight) (chinche opaca occidental de las plantas), 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 medible en el nivel celular del ARNm transcrito desde el polinucleótido y/o, péptido codificante, polipéptido o producto de 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 la que se logra la inhibición específica.

- 5 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 una lista que comprende *D. v. virgifera* LeConte (WCR); *D. barberi* Smith y Lawrence (NCR); *D. u. howardi* (SCR); *D. v. zea* (MCR); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. u. undecimpunctata*
10 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
15 y proteínas 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
20 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 de sentido y
25 antisentido de ARN, ADNc, ADNg, y las formas sintéticas y polímeros mezclados de los mencionados precedentemente. 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 posee al menos 10 bases de longitud,
30 a menos que se especifique otra cosa. Por convención, la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico se lee desde el extremo 5' al 3' de la molécula. El "complemento" de una molécula de

ácido nucleico se refiere a un polinucleótido que posee nucleobases que pueden formar pares de base 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 en una molécula de ARN que es el complemento de una molécula de ARNm. En estas modalidades, el complemento del ácido nucleico transcrito en 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 desde el complemento que puede hibridar 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 ende a un polinucleótido que posee nucleobases, de 5' a 3', que pueden formar pares de base 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 precedentemente se demuestra en la siguiente ilustración:

ATGATGATG polinucleótido

TACTACTAC "complemento" del polinucleótido

CATCATCAT "complemento inverso" del polinucleótido

Otras modalidades de la invención pueden incluir moléculas de ARNi formadoras de ARN horquilla. En estas moléculas de ARNi, tanto el complemento de un ácido nucleico que será objeto 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 de sentido y antisentido de un ácido nucleico ya sea como hebras únicas individuales o en dúplex. El término "ácido ribonucleico" (ARN) es inclusivo de ARNi (ARN inhibidor), ARNdh (ADN de doble hebra), ARNip (ARN interferente pequeño), ARNhp (ARN de horquilla pequeña), ARNm (ARN mensajero), miARN (microARN), ARNhorq (ARN horquilla), ARNt (ARN de transferencia, ya sean cargados o no cargados 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", "ácido nucleico" y sus "fragmentos" como un término que incluye tanto ADNg, ARN ribosomal,

ARN de transferencia, ARN mensajero, 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 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 "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 entre ellos 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 derivados, 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 de internucleótidos (por ejemplo, uniones no cargadas: por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforoamidatos, carbamatos, *etc.*; uniones cargadas: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, *etc.*; fracciones pendientes: por ejemplo, péptidos; intercaladores: por ejemplo, acridina, psoralen, *etc.*; quelantes; alquilantes; y uniones modificadas: 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, pero no se limitan a: ADNg; ADNc; ESE; 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 codificador transcripto" se refiere a un ácido nucleico que se transcribe en 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 (ARN pequeño nuclear) como, por ejemplo, U4, U5, U6, y similares. Los polinucleótidos no codificantes transcritos también incluyen, por ejemplo y sin limitación, ARN pequeños (ARNp), término que se utiliza con frecuencia para describir ARN no codificantes bacterianos pequeños; ARN nucleolar pequeño (ARNnop); microARN (miARN); ARN interferente pequeño (ARNip); ARN que interactúa con Piwi (ARNpi); y ARN no codificante largo. 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 de ARN letal: De acuerdo con su uso en la presente, el término "interferencia por ARN letal" se refiere a la interferencia del ARN que resulta en la muerte o la reducción de la viabilidad del sujeto individual 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 a ADN cromosómico hallado dentro del núcleo de una célula y se refiere también al ADN de organelo hallado dentro de los componentes subcelulares de la célula. En algunas modalidades de la invención, puede introducirse 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, puede introducirse 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 con una ventana de comparación, donde la parte de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, espacios) en comparación con 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 se produce 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.

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 and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443; Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 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.* (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 pueden 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 Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) se encuentra 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 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,

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

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 mediante métodos muy conocidos

en la técnica. Un polinucleótido no necesita ser 100 % complementario de 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 utilizadas.

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

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, 2^a 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 respecto a la 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.

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 falta 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 aquellas en las que las moléculas con más de 20 % de falta de coincidencia no hibridarán; las condiciones de "alta rigurosidad" son aquellas en las que las secuencias con más de 10 % de falta de coincidencia no hibridarán; y las condiciones de "rigurosidad muy alta" son aquellas en las que las secuencias con más del 5 % de falta de coincidencia no hibridarán.

Se proveen a continuación condiciones de hibridación representativas, no limitantes.

Condición de alta rigurosidad (detecta polinucleótidos que comparten al menos 90 % de identidad de secuencia): hibridación en tampón de SSC 5X a 65 °C durante 16 horas; lavar dos veces en tampón de SSC 2x a temperatura ambiente durante 15 minutos cada lavado; y lavar dos veces en tampón de 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 de SSC 5x-6x a 65-70 °C durante 16-20 horas; lavar dos veces en tampón de SSC 2x a temperatura ambiente durante 5-20 minutos cada lavado; y lavar dos veces en tampón de SSC 1x SSC a 55-70 °C durante 30 minutos cada lavado.

Condición de control no rigurosa (los polinucleótidos que comparten al menos 50 % de identidad de secuencia hibridarán): Hibridación en tampón de SSC 6x a temperatura ambiente hasta 55 °C durante 16-20 horas; lavar al menos dos veces en tampón de SSC 2x-3x a temperatura ambiente hasta 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 posee 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 NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82 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 secuencia. Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener de aproximadamente 80 % a 100 % de identidad de secuencia, 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 la 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 una lectura de polinucleótidos en la dirección 5' a 3' es complementario de cada nucleótido del otro polinucleótido cuando se leen en la dirección 3' a 5'. Un polinucleótido que es complementario de un polinucleótido de referencia presentará una secuencia idéntica al complemento inverso del polinucleótido de referencia. Estos términos y descripciones se hallan bien definidas en la técnica y son fácilmente comprendidas 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 marco abierto de lectura fusionado por traducción). Sin embargo, los ácidos nucleicos no necesitan ser contiguos para unirse en forma operativa.

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-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 unidos operativamente a un polinucleótido codificante pueden ubicarse 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

- 5 ADN que puede hallarse corriente arriba del inicio de la transcripción y que puede estar involucrada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un promotor puede unirse operativamente a un polinucleótido codificante para la expresión en una célula o un promotor puede unirse operativamente a un polinucleótido que codifica un péptido de señal que puede unirse operativamente a un polinucleótido codificante para la expresión en una célula.
- 10 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 e "específicos de tejido". Un promotor "específico del tipo celular" conduce principalmente la expresión en ciertos
- 15 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 medioambiental. Los ejemplos de condiciones medioambientales que pueden iniciar la transcripción mediante promotores inducibles incluyen condiciones anaeróbicas y la presencia de luz. Los promotores específicos de
- 20 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

25 aumenta en respuesta a un agente inductor. Los promotores inducibles ilustrativos incluyen, en forma no limitante: 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 esteroide, cuya actividad transcripcional puede inducirse mediante una hormona glucocorticosteroide (Schena *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:0421).

- 30 Los promotores constitutivos ilustrativos incluyen, en forma no limitante: Promotores de virus de plantas, como, por ejemplo, el promotor 35S del virus mosaico del 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. Los vegetales transformados con una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido codificante operativamente unido a un promotor específico de tejido, puede producir el producto del polinucleótido codificante exclusivamente, o con preferencia, en un tejido específico. Los promotores ilustrativos específicos de tejido o preferidos de tejido incluyen, en forma no limitante: un promotor preferido de semilla, como, por ejemplo, aquel del gen de la faseolina; un promotor específico de hojas e inducido por luz como, por ejemplo, aquel de *cab* o *rubisco*; un promotor específico de anteras como, por ejemplo, aquel de *LAT52*; un promotor específico de polen, como, por ejemplo, aquel de *Zm13*; y un promotor preferido de microesporas como, por ejemplo, aquel de *apg*.

Planta de soja: De acuerdo con su uso en la presente, el término "planta de soja" se refiere a una planta de una especie del género *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 es "transformada" 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 limitante: 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).

Transgén: Un ácido nucleico exógeno. En algunos ejemplos, un transgén 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 de una molécula de ácido nucleico hallada en una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En otros ejemplos, un transgén puede ser un polinucleótido antisentido, donde la expresión del polinucleótido antisentido inhibe la expresión de un ácido nucleico objetivo,

por lo cual produce un fenotipo de ARNi. En incluso otros ejemplos, un transgén 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 transgén puede contener elementos reguladores operativamente unidos a un polinucleótido codificante del transgén (por ejemplo, un promotor).

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 limitante: un plásmido; cósmido; bacteriófago; o virus que porta ADN exógeno en una célula. Un vector también puede incluir uno o más genes, que incluyen aquellos que producen moléculas antisentido, y/o genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar, o infectar una célula, 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 en la célula (por ejemplo, un liposoma, recubrimiento de proteína, *etc.*).

Rendimiento: Un rendimiento estabilizado de aproximadamente 100 % o mayor respecto del 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 posee un rendimiento estabilizado de 105 % o más respecto del rendimiento de las variedades testigo en la misma ubicación de crecimiento, que contiene densidades 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.

A menos que se explique de otro modo específicamente, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el comprendido 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 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-

o 100 % idéntica) a la secuencia de aminoácidos de un producto de proteína de un polinucleótido de *rpII33*. Un gen objetivo puede ser cualquier polinucleótido de *rpII33* en una plaga de insectos, cuya inhibición postranscripcional posee un efecto perjudicial en el crecimiento, la supervivencia y/o viabilidad de la plaga, por ejemplo, para proporcionar un beneficio protector en un vegetal 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 contigua de aminoácidos 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.:77; o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79.

Se proveen de acuerdo con la invención ADN, cuya expresión resulta en una molécula de ARN que comprende un polinucleótido específicamente complementario de toda 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 positiva 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 del crecimiento, desarrollo y/o supervivencia 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); donatrones (por ejemplo, ARN no codificante requerido para proporcionar secuencias donantes para el *transempalme*); y otros ARN transcritos no codificantes de genes de plagas de insectos objetivo. Estos polinucleótidos pueden derivar de genes monocistrónicos como también policistrónicos.

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 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 de 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, un vegetal o una 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 de la totalidad o parte de un ácido nucleico objetivo en una plaga de insectos. Se describen también constructos de ADN recombinante de uso para el logro en la transformación estable de objetivos huéspedes particulares. Los objetivos huéspedes 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 unido operativamente a un promotor heterólogo funcional en una célula vegetal, donde la expresión del polinucleótido resulta en una molécula de ARN que comprende una cuerda 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 organismo *Diabrotica* que comprende un polinucleótido de *rpII33* (por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, y 5-8); la totalidad o parte de un ácido nucleico nativo aislado de un organismo hemíptero que comprende un polinucleótido de *rpII33* (por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:76, 78, y 80-82); ADN que al expresarse resulta en una molécula de ARN que comprende el polinucleótido que es específicamente complementario de la totalidad o parte de una molécula de ARN nativa que es codificada por *rpII33*; moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, and ARNhorq) que comprenden al menos un polinucleótido que es específicamente complementario de la totalidad o parte de *rpII33*; ADNc que puede usarse para la producción de moléculas de ARNd, moléculas de ARNip, moléculas de miARN, moléculas de ARNhp, y/o moléculas de ARNhorq que son específicamente complementarias de la totalidad o parte de *rpII33*; y constructos de ADN recombinante para usar en el logro de una transformación estable de objetivos huéspedes particulares, donde un objetivo huésped transformado comprende una o más de las moléculas de ácido nucleico mencionadas precedentemente.

B. Moléculas de ácido nucleico

La presente invención provee, *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 iARN en una célula o microorganismo para inhibir la expresión génica objetivo en una célula, un tejido u órgano de una plaga de insectos.

Algunas modalidades de la invención proveen una molécula de ácido nucleico aislada que comprende

5 al menos un polinucleótido (por ejemplo, uno, dos, tres o más) seleccionado del grupo que consiste en: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 o 3; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 o 3; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 o 3 (por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8); el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 o 3; un polinucleótido
10 codificante nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8; y el
15 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 NÚMS. DE IDENT.:5-8.

Otras modalidades de la invención proveen una molécula de ácido nucleico aislado que comprende al menos un polinucleótido (por ejemplo, uno, dos, tres, o más) seleccionado del grupo que consiste en:

20 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 o 78; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 o 78; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 o 78 (por ejemplo cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82); el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 o 78; un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende cualquiera de las
25 SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82; y el
30 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 NÚMS. DE IDENT.:80-82.

En modalidades particulares, el contacto con una plaga de insectos o la captación por una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) de un ARNi transcrito del polinucleótido aislado inhibe el crecimiento, 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 o cebo que comprende el ARNi. En algunas modalidades, el contacto con el insecto o la captación por el 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.:92; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:92; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:92 o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93 (por ejemplo, SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:94-97); el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:92 o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:94-97; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:94-97; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:94-97; 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 NÚMS. DE IDENT.:94-97.

En otras 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.: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; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:98 o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99 (por ejemplo, SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:100-102); el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:98 o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99; un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:100-102; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las

SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:100-102; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:100-102; 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 NÚMS. DE IDENT.:100-102.

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 la supervivencia, el crecimiento, la reproducción y/o la alimentación de la plaga.

En ciertas modalidades, las moléculas de ARNdh provistas por la invención comprenden polinucleótidos complementarios de un transcrito de un gen objetivo que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82, 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, desarrollo u otra función biológica de la plaga. Un polinucleótido seleccionado puede presentar desde aproximadamente 80 % hasta aproximadamente 100 % de identidad de secuencia respecto de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82; un fragmento contiguo de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82; y el complemento de cualquiera de los mencionados precedentemente. 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 secuencia respecto de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82; un fragmento contiguo de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82; y el complemento de cualquiera de los mencionados precedentemente.

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 génica objetivo, puede comprender un único polinucleótido que es específicamente complementario a la totalidad o parte de un polinucleótido nativo hallado 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 algunas 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 iARN diferentes, donde cada una de las diferentes moléculas de ARNi comprende un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, 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 cada molécula de ARNdh, mediante apareamiento de bases intramolecular específico de los polinucleótidos de nucleótidos primero y segundo. El primer polinucleótido o el segundo polinucleótido puede ser sustancialmente idéntico 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*. Ver 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, ARNips), 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 separan formando un ARN de una hebra en la célula. Las moléculas de ARNip luego

hibridan específicamente con ARN transcriptos a partir de un gen objetivo y ambas moléculas de ARN son degradadas sustancialmente 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 de moléculas heterólogas de ácido nucleico 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 tal molécula de ácido nucleico se provee 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 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 puede predecirse con certeza si un polinucleótido nativo en particular puede ser regulado 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, alimentación y/o supervivencia de una plaga de insectos. La gran mayoría de los polinucleótidos nativos de las plagas de coleópteros y hemípteros, como, por ejemplo, ESE aisladas de ellos (por ejemplo, los polinucleótidos de plagas de coleópteros mencionados en la patente de invención estadounidense 7,612,194) no poseen un efecto perjudicial en el crecimiento y/o la viabilidad de la plaga. Tampoco es predecible cuál de los polinucleótidos nativos que pueden tener un efecto perjudicial en una plaga de insectos puede usarse

en técnicas recombinantes para expresar moléculas de ácido nucleico complementarias de dichos polinucleótidos nativos en una planta huésped y proporcionar el efecto perjudicial a la plaga cuando ésta se alimenta sin ocasionar daños en la planta huésped.

5 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 y/o la supervivencia de las plagas, como, por ejemplo, polipéptidos que participan en las rutas bioquímicas metabólicas o catabólicas, división celular, metabolismo de la energía, digestión, reconocimiento de la planta huésped y similares. De acuerdo con lo descrito en la presente, la
10 ingestión de las composiciones por un organismo plaga objetivo que contiene uno o más ARNdh, al menos un segmento del cual es específicamente complementario a al menos 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
15 de plagas. La planta huésped de la plaga de coleópteros y/o hemípteros (por ejemplo, *Z. mays* 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 proveen 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 está
20 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 inhibición de su crecimiento o desarrollo.

En algunas modalidades, 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
25 para usar en la presente invención pueden incluir, por ejemplo, aquellos que desempeñan funciones importantes en la viabilidad, el movimiento, la migración, el crecimiento, 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. Además, un polinucleótido nativo de una plaga de insectos para usar en la presente invención también puede derivarse de un homólogo (por ejemplo, ortólogo)
30 de un gen vegetal, viral, bacterial 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 otras modalidades, la invención provee métodos para obtener una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido para producir una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNd_h, ARNi_p, miARN, ARNh_p, y ARNh_{orq}). 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 ARNd_h en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros o hemípteros); (b) sondear una biblioteca de ADN_c o ADN_g con una sonda que comprende la totalidad o una parte 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 mediado por ARNd_h; (c) identificar un clon de ADN que hibrida específicamente con la sonda; (d) aislar el clon de ADN identificado en el paso (b); (e) secuenciar el fragmento de ADN_c o ADN_g que comprende el clon aislado en el paso (d), donde la molécula de ácido nucleico comprende la totalidad o una parte sustancial del ARN o uno de sus homólogos; y (f) sintetizar químicamente la totalidad o una parte considerable de un gen, o una ARNi_p, miARN, ARNh_{orq}, ARNm, ARNh_p, o ARNd_h.

En otras modalidades, un método para obtener un fragmento de ácido nucleico que comprende un polinucleótido para producir una parte sustancial de una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNd_h, ARNi_p, miARN, ARNh_p, y ARNh_{orq}) incluye: (a) sintetizar los cebadores de oligonucleótidos primero y segundo específicamente complementarios de una parte de un polinucleótido nativo de una plaga de insectos fijada como objetivo (por ejemplo, coleópteros o hemípteros); y (b) amplificar un inserto de ADN_c o ADN_g presente en un vector de clonación con el uso de los cebadores de oligonucleótidos primero y segundo del paso (a), donde la molécula de ácido nucleico amplificada comprende una parte sustancial de una molécula de ARNi_p, miARN, ARNh_{orq}, mARN, ARNh_p, o ARNd_h.

Los ácidos nucleicos pueden aislarse, amplificarse, o producirse mediante varios abordajes. Por ejemplo, una molécula de iARN (por ejemplo, ARNd_h, ARNi_p, miARN, ARNh_p, y ARNh_{orq}) puede obtenerse mediante amplificación por PCR de un polinucleótido objetivo (por ejemplo, un gen objetivo o un polinucleótido no codificador, transcripto, objetivo) derivado de una biblioteca de ADN_g o ADN_c, o partes 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 entendidos en la técnica. Las bibliotecas de ADN_g o ADN_c 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 mínimos promotores. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico pueden sintetizarse mediante cualquiera de varias técnicas (Ver, por ejemplo, Ozaki *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research*, 20: 5205-5214; y Agrawal *et al.* (1990) *Nucleic Acids Research*, 18: 5419-5423), 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; patente de invención estadounidenses 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, el 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 ARN, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, o ARNhorq. Puede producirse ARN 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. Ver, por ejemplo, la publicación internacional PCT núm. WO97/32016; y las patentes de invención estadounidenses 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 una 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 estabilización de las hebras dúplex de la molécula de ARNdh.

En modalidades particulares, 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 dirigirse 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); 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 diseñar 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 transcriben *in vitro* o *in vivo*, pueden ser, o no, poliadeniladas, y pueden ser, o no, capaces de traducirse a un polipéptido por un aparato de traducción de la célula.

D. Vectores recombinantes y transformación de la célula huésped

En algunas modalidades, la invención también provee una molécula de ADN para introducirse en una célula (por ejemplo, una célula bacteriana, una célula de levadura, o una célula vegetal), 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 proveen 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 génica 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. Ver, por ejemplo, la publicación internacional de PCT núm. WO06/073727; y la publicación de patente de invención estadounidense núm. 2006/0200878 A1).

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 recombinantes pueden codificar ARN que pueden formar moléculas de ARNdh capaces de inhibir la expresión de genes objetivo endógenos en una célula de una plaga de insectos

(por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) al ingerirse. 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 algunas modalidades, puede formarse una hebra de una molécula de ARNdh mediante la transcripción de un polinucleótido que es sustancialmente homólogo a un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 76, y 78; los complementos de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 76, y 78; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 76, y 78 (por ejemplo, SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8 y 80-82); el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 76, y 78; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8; 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 NÚMS. DE IDENT.:5-8; un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificador nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82; 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 NÚMS. DE IDENT.:80-82.

En otras modalidades, puede formarse una hebra de una molécula de ARNdh mediante la transcripción de un polinucleótido que es sustancialmente homólogo a un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8 y 80-82; el complemento de cualquiera de las SEC ID Nros:5-8 y 80-82; los fragmentos de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8 y 80-82; y los complementos de fragmentos de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8 y 80-82.

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 la que al menos dos polinucleótidos se disponen de manera tal que un polinucleótido se halla en orientación 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) hasta 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 *rpII33* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82) 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 codificantr sentido y un polinucleótido codificantr antisentido pueden tener diferentes longitudes.

Los polinucleótidos identificados como poseedores de un efecto perjudicial sobre una plaga de insectos o un efecto protector de plantas con respecto a la plaga pueden incorporarse fácilmente en 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 mediante cuando se toma un primer segmento correspondiente a un polinucleótido de gen objetivo (por ejemplo, un gen *rpII33* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82, y los fragmentos de cualquiera de los mencionados anteriormente); la unión de este polinucleótido a una segunda región espaciadora de segundo segmento que no es homóloga o complementaria del primer segmento; y unir este último a un tercer segmento, donde al menos una parte del tercer segmento es sustancialmente complementaria al primer segmento. Este constructo forma una estructura de tallo y bucle mediante un apareamiento intramolecular de bases del primer segmento con el tercer segmento, donde las formas de la estructura de bucle comprenden al segundo segmento. Ver, por ejemplo, las publicaciones de patentes de invención estadounidenses núms. 2002/0048814 y 2003/0018993; y las publicaciones internacionales del PCT núms. WO94/01550 y WO98/05770. Puede generarse una molécula de ARNdh, por ejemplo, en forma de una estructura de doble hebra como, por ejemplo, una estructura de tallo-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 dirigido, por ejemplo sobre un casete expresable en

plantas adicional, que conduce a una mejor producción de ARNi o reduce la metilación para prevenir el silenciamiento transcripcional génico del promotor 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

- 5 niveles de expresión de una o más moléculas de ARNi inhiben 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
- 10 ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo, pueden 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.
- 15 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 contra una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) a una planta transgénica, puede, por ejemplo, transcribirse un ADN recombinante en una molécula de ARNi (por ejemplo, una molécula de ARN que forma una molécula de ARNdh) dentro
- 20 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 contactar 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
- 25 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.

- 30 A los efectos de posibilitar la administración de las moléculas de ARNi en una plaga de insectos en una relación nutricional con una célula vegetal que fue 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 unido operativamente 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 la que se amplificará la molécula de ácido nucleico, y una célula vegetal en la que 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, los cuales son muy conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes que describen a tales promotores incluyen las patentes de invención estadounidenses 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 publicación de patente de invención estadounidense 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. Estados Unidos de América 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 mosaico del 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 mosaico de la escrofularia (Walker *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 84(19):6624-8); el promotor de la sucrosa sintasa (Yang y Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 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 de la clorofila a/b; 35S del CaMV (Patentes de invención estadounidenses 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196); 35 del FMV (Patentes de invención estadounidenses 6,051,753, y 5,378,619); un promotor de PC1SV (Patente de invención estadounidense 5,850,019); promotor SCP1 (Patente de invención estadounidense 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. Ver, por ejemplo, las patentes de invención estadounidenses 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 la raíz orientados en direcciones de transcripción opuestas respecto del polinucleótido o fragmento y que son operables en una célula vegetal transgénica y expresados allí para producir moléculas de ARN en la célula vegetal transgénica que posteriormente puede formar moléculas de ARNdh, de acuerdo con lo descrito, *supra*. Las moléculas de ARNi expresadas en los tejidos vegetales pueden ingerirse por una plaga de insectos de manera que puede lograrse la supresión de la expresión génica objetivo.

Los elementos reguladores adicionales que opcionalmente pueden unirse de manera operativa a un ácido nucleico incluyen UTR 5' ubicadas entre un elemento promotor y un polinucleótido codificante que funcionan como elemento conductor de la traducción. El elemento conductor 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 la proteína de choque por calor del maíz y petunia (Patente de invención estadounidense 5,362,865), líderes de la proteína de recubrimiento de virus de plantas, líderes de rubisco de plantas, y otros. Ver, por ejemplo, Turner y Foster (1995) Molecular Biotech. 3(3):225-36. Los ejemplos no limitantes de UTR 5' incluyen GmHsp (Patente de invención estadounidense 5,659,122); PhDnaK (Patente de invención estadounidense 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 unirse opcionalmente operativamente a un ácido nucleico 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 proveen 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 hacerse derivar de diversos genes vegetales, o de genes de T-ADN. Un ejemplo no limitativo 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. Estados Unidos de América 80:4803-7). Un ejemplo del uso de diferentes regiones no traducidas 3' se provee en Ingelbrecht *et al.*, (1989) Plant Cell 1:671-80. Ejemplos no limitativos de señales de poliadenilación incluyen aquellas de un gen 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 precedentemente unido operativamente a uno o más polinucleótidos de la presente invención. Cuando se expresan, 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 de más de un polinucleótido objetivo, 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 de 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 del polinucleótido adicional en el mismo plásmido, donde el polinucleótido adicional se halla unido operativamente a los mismos elementos reguladores que los del 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 han de inhibir pueden obtenerse de la misma especie de plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros o hemípteros), 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 agente es

efectivo. Cuando múltiples genes se definen como objetivo para la supresión o una combinación de expresión y supresión, puede diseñarse un elemento de ADN policistrónico.

Una molécula de ácido recombinante o vector de la presente invención puede comprender un marcador seleccionable que confiere un fenotipo seleccionable sobre una célula transformada, como, por ejemplo, una célula vegetal. Los marcadores seleccionables 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 biocida, 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 limitante: un gen *neo* que codifica la resistencia a kanamicina y puede seleccionarse para usar 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* resistente al metotrexato. Se hallan disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a la ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puomicina, espectinomicina, rifampicina, estreptomicina, tetraciclina, y similares. Los ejemplos de tales marcadores de selección se ilustran, por ejemplo, en las patentes de invención estadounidenses 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 de cribado pueden usarse para monitorear la expresión. Los marcadores de cribado ilustrativos 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-ηj* allele by transposon tagging with *Ac*." 18° Simposio de Genética Stadler, 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. Estados Unidos de América 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 los introducen en las plantas.

- 10 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 (ver, por ejemplo, la patente de invención estadounidense 5,508,184), mediante captación de ADN mediada por inhibición/disecado (Ver, por ejemplo, Potrykus *et al.* (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183-8), mediante electroporación (véase, por ejemplo, la patente de invención estadounidense 5,384,253), mediante agitación con fibras de carburo de silicio (ver, por ejemplo, las patentes de invención estadounidenses 5,302,523 y 5,464,765), transformación mediada por *Agrobacterium* (ver, por ejemplo, las patentes de invención estadounidenses 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 (ver, por ejemplo, las patentes de invención estadounidenses 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 invención estadounidenses 7,060,876 y 5,591,616; y en la publicación internacional del PCT WO95/06722. Mediante la aplicación de técnicas como éstas, 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.
- 25 En el caso de especies multicelulares, las células transgénicas pueden regenerarse en un organismo transgénico. Cualquiera de estas técnicas puede utilizarse 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 de las plantas. 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 las plantas transformadas. Otro segmento del plásmido Ti, la región Vir, es responsable para la transferencia de T-ADN. La región de T-ADN se encuentra limitada por repeticiones de terminales. En los vectores binarios modificados, los genes inductores de tumores se han suprimido 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 eficiente de células transgénicas y plantas transgénicas y un sitio de clonación múltiple para insertar polinucleótidos para la transferencia como, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica ARNdh.

De este modo, en algunas modalidades, un vector de transformación de plantas se deriva de un plásmido Ti de *A. tumefaciens* (ver, por ejemplo, las patentes de invención estadounidenses 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 limitante, 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 precedentemente. 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 vegetales 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 otro cultivo 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 de cribado, de acuerdo con lo establecido anteriormente, con el vector de transformación utilizado para generar el transformante. En el caso en el que se utiliza 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 selectivos. En el caso en el que se utiliza un marcador de cribado, las células pueden cribarse para detectar el rasgo de gen marcador deseado.

Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo 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, puede modificarse 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 la planta, 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 hacia la formación del brote. Los cultivos se transfieren periódicamente hasta que se produce una formación de brotes suficientes. Una vez formados los brotes, se los transfiere 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 su posterior 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 génica objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros en las plantas que están en la etapa de regeneración, pueden realizarse diversos ensayos. Estos ensayos incluyen, por ejemplo: ensayos biológicos moleculares, como, por ejemplo, Southern y northern blotting, 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 western blots) 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.

Pueden analizarse 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 limitante, la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN_g derivado de tejido aislado de callo de una planta huésped del 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 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 homocigoto con respecto a un transgén 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 transgén. La germinación de la semilla T₁ resulta en plantas que pueden someterse a prueba para determinar la heterocigosidad, generalmente con un ensayo 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 posee un efecto inhibitor 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. Pueden expresarse 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 NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 76, y 78), 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 posee 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 un vegetal transgénico, que 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, 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

limitante: 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 productos básicos ("commodities") o productos de productos básicos es una prueba *de facto* que la mercancía 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 molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender también al menos otro evento transgénico en su genoma, que incluye en forma no limitante: un evento transgénico del cual se transcribe una molécula de ARNi que se dirige 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.:76, y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78, como, por ejemplo, uno o más loci seleccionados del grupo que consiste en *Caf1-180* (publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2012/0174258), *VatpaseC* (publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2012/0174259), *Rho1* (publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2012/0174260), *VatpaseH* (publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2012/0198586), *PPI-87B* (publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2013/0091600), *RPA70* (publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2013/0091601), *RPS6* (publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2013/0097730), *ROP* (publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 14/577811), *ARNPII* (publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 14/577854), *Dre4* (solicitud de patente de invención estadounidense núm. 14/705.807), *ncm* (solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/095487), *COPI alpha* (solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/063,199), *COPI beta* (solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/063,203), *COPI gamma* (solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/063,192), *COPI delta* (62/063,216), *ARN polimerasa II* (solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/133214), y *I1215 de ARN polimerasa* (solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/133202); un evento transgénico del que se transcribe una molécula de ARNi que se dirige 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 provee tolerancia al glifosato); y un 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
5 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 de las plantas que alojan un único rasgo de control, por ejemplo, en virtud de la menor probabilidad de
10 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
15 plaga de insectos, 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
20 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 nutricional. 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
25 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
30 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 *rpII33* en una formulación de cebos como, por ejemplo, la descrita en una patente de invención estadounidense núm. 8,530,440 que se incorpora a la presente por referencia.

- 5 Generalmente, con los cebos, los cebos se colocan en el medioambiente de la plaga de insectos o en los alrededores del ambiente la plaga de insectos, por ejemplo, el WCR puede entrar en contacto con el cebo y/o ser atraído por el cebo.

B. Supresión del gen objetivo mediada por ARNi

- En ciertas modalidades, la invención provee moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, 10 miARN, ARNhp, y ARNhorq) que pueden diseñarse para apuntar a polinucleótidos nativos esenciales (por ejemplo, genes esenciales) en el transcriptoma de una plaga de insectos (por ejemplo, un coleóptero (por ejemplo, WCR, SCR, y NCR) 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 15 una molécula de ARNi diseñada de ese modo puede ser idéntica a aquella del polinucleótido objetivo o puede incorporar faltas de coincidencias que no evitan la hibridación específica entre la molécula de ARNi y su polinucleótido objetivo.

- 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 20 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, con inclusión de la reducción de la expresión de la proteína de un gen o un 25 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 para la supresión y la molécula de ARNi correspondiente utilizada para la supresión. Adicionalmente, la inhibición postranscripcional se refiere a la reducción considerable y medible de la cantidad de ARNm disponible en la célula para la 30 unión a los ribosomas.

En las modalidades particulares en las que una molécula de ARNi es una molécula de ARNdh, la molécula de ARNdh puede ser escindida 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 ante 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 en 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, Argonaute (componente catalítico del complejo RISC).

En algunas modalidades de la invención, puede usarse cualquier forma de molécula de ARNi. Los expertos en la técnica entenderán que las moléculas de ARNdh generalmente son más estables durante la preparación y durante el paso de proporción 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 ARNip y miARN, por ejemplo, pueden ser igualmente efectivas en algunas modalidades, puede elegirse una molécula de ARNdh debido a su estabilidad.

En ciertas modalidades, se provee una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que 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 modalidades, la molécula de ARNi transcrita *in vitro* puede ser una molécula de ARNdh estabilizada que comprende una estructura de tallo-bucle. Luego de que una plaga de insectos contacta 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 comprende al menos 15 nucleótidos contiguos (por ejemplo, al menos 19 nucleótidos contiguos) de un polinucleótido se utiliza en un método para la inhibición postranscripcional de un gen objetivo en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), 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; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6; 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; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC. CON

NÚM. DE IDENT.:1 o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8; 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 NÚMS. DE IDENT.:5-8; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78; el complemento de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78; un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82; 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 NÚMS. DE IDENT.:80-82. En ciertas modalidades, puede usarse la 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 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 100 %, y 100 %) con respecto a cualquiera de las mencionadas precedentemente. En estas y otras modalidades, puede expresarse una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente a una molécula de ARN presente en al menos una célula de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros).

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

La inhibición de un gen objetivo que utiliza la tecnología de iARN 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 aquella de una parte 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 supresiones respecto de un polinucleótido objetivo. En modalidades particulares, una molécula de ARNi y una parte de un gen objetivo pueden compartir una identidad de secuencias, por ejemplo, al menos desde aproximadamente 80 %, al menos desde aproximadamente 81 %, al menos desde aproximadamente 82 %, al menos desde aproximadamente 83 %, al menos desde aproximadamente 84 %, al menos desde aproximadamente 85 %, al menos desde aproximadamente 86 %, al menos desde aproximadamente 87 %, al menos desde aproximadamente 88 %, al menos desde aproximadamente 89 %, al menos desde aproximadamente 90 %, al menos desde aproximadamente 91 %, al menos desde aproximadamente 92 %, al menos desde aproximadamente 93 %, al menos desde aproximadamente 94 %, al menos desde aproximadamente 95 %, al menos desde aproximadamente 96 %, al menos desde aproximadamente 97 %, al menos desde aproximadamente 98 %, al menos desde aproximadamente 99 %, al menos desde aproximadamente 100 %, y 100 %. Alternativamente, la región dúplex de una molécula de ARNdh puede ser específicamente hibridable con una parte 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 parte 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 de 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 objeto que es inhibido. 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 de la transcripción es mediada por la presencia en una célula de una molécula de ARNdh que presenta una identidad de secuencia considerable con respecto a un ADN promotor o su complemento para efectuar lo que se menciona como "transsupresión del promotor". La supresión de genes puede ser efectiva contra genes objetivo en una plaga de insectos que puede ingerir o contactar 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 transsupresión 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 de genes postranscripción mediante ARN con orientación sentido o antisentido para regular la expresión génica en células vegetales se halla descrita en las patentes de invención estadounidenses 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 al hacer 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 proveer 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 de 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 *rpII33*, por ejemplo, que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 76, 78, y 80-82. Por lo tanto, se proveen moléculas de ácido nucleico sustancialmente purificadas que incluyen, en forma no limitante, polinucleótidos producidos en forma no natural y constructos de ADN recombinante, 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 plantas y el control de una población de la plaga de plantass. 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); para transformar una célula vegetal o una planta; y
5 generar la célula vegetal transgénica o la planta transgénica que contiene la molécula de ARNi transcrita.

A los efectos de conferir una protección contra plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) a una planta transgénica, una molécula de ADN recombinante, por ejemplo, puede transcribirse en una molécula de ARNi, como, por ejemplo, una molécula de ARNdh, una molécula
10 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
15 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 dla planta transgénica contra la plaga. Se demostró que los efectos moduladores de las moléculas de ARNdh son aplicables a diversos genes expresados en plagas, que incluyen, por ejemplo, genes endógenos responsables del metabolismo celular o la transformación
20 celular, que incluye genes constitutivos; factores de la transcripción; genes relacionados con la muda; y otros genes que codifican polipéptidos involucrados en el metabolismo celular o en el crecimiento y desarrollo normales.

Para la transcripción de un transgén *in vivo* o un constructo de expresión, puede usarse una región reguladora (por ejemplo, promotor, potenciador, silenciador y señal de poliadenilación) en algunas
25 modalidades para transcribir una o más hebras del ARN. Por lo tanto, en algunas modalidades, de acuerdo con lo establecido anteriormente, 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
30 operativamente unido, puede estar además flanqueado por elementos adicionales que efectúan ventajosamente su transcripción y/o la estabilidad de un transcrito resultante. Estos elementos pueden ubicarse en corriente arriba del promotor operativamente unido, corriente abajoe del extremo 3' del

constructo de expresión, y puede producirse tanto corriente arriba del promotor como así también corriente abajo del extremo 3' del constructo de expresión.

Algunas modalidades proveen métodos para reducir el daño en una planta huésped (por ejemplo, una planta de maíz) ocasionado por una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) que se alimenta de la planta, 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, donde una o más moléculas de ácido nucleico funcionan al ser captadas 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 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 se hibrida específicamente 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 nucleico consisten en un polinucleótido específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de la plaga de insectos.

En otras modalidades, se provee un método para aumentar el rendimiento de un cultivo de maíz, el método comprende introducir en una planta de maíz al menos una molécula de ácido nucleico de la invención; cultivar la planta de maíz para permitir la expresión de una molécula de ARNi que comprende el ácido nucleico, 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 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 que se hibrida específicamente a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de una plaga de coleópteros y/o hemípteros.

En ciertas modalidades, se provee 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, donde el polinucleótido se halla operativamente unido a un promotor y a un

elemento de terminación de la transcripción; cultivar la célula vegetal transformada en condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo de células vegetales que incluye una pluralidad de células vegetales transformadas; seleccionar las células vegetales transformadas que poseen el polinucleótido integrado en sus genomas; cribar las células vegetales transformadas para 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 a la plaga de insectos con la célula vegetal transgénica seleccionada. 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 que se hibrida específicamente 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 que se hibrida específicamente 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 o 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. Se considera que una célula vegetal que comprende un gen recombinante es un evento transgénico. Se incluyen también en las modalidades de la invención sistemas de administración para administrar moléculas de ARNi a las 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 el 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 rociarse sobre una superficie vegetal. Alternativamente, una molécula de ARNi puede expresarse por un microorganismo y el microorganismo puede aplicarse sobre la superficie de la planta o introducir en una raíz o un tallo mediante un medio físico como, por ejemplo, inyección. De acuerdo con lo expuesto anteriormente en la presente, una planta transgénica también puede diseñarse genéticamente para expresar al menos una molécula de ARNi en una cantidad suficiente para matar las plagas de insectos conocidas como infestadoras de la planta. Las moléculas de ARNi producidas mediante una síntesis química o enzimática también pueden formularse de manera coherente con las prácticas

agrícolas comunes y pueden usarse como productos de atomización para controlar el daño ocasionado por una plaga de insectos en las plantas. Las formulaciones pueden incluir los adyuvantes adecuados (por ejemplo, adherentes y humectantes) requeridos para un cubrimiento foliar eficaz, así como también protectores contra la radiación UV para proteger las moléculas de iARN (por ejemplo, moléculas de ARNdh) contra el daño causado por la radiación UV. Estos aditivos se utilizan 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 como referencia a la presente en la medida que no sean inconsistentes con los detalles explícitos de esta divulgación y se incorporan de este modo en el mismo grado, tal como si cada referencia se indicara individual o específicamente incorporada como referencia y se estableciera en su totalidad en la presente. Las referencias explicadas en la presente se proveen sólo 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 divulgación en virtud de una invención anterior.

Los siguientes EJEMPLOS se proveen a los efectos de ilustrar ciertas características y/o aspectos particulares. Estos EJEMPLOS no deben interpretarse como limitativos de la divulgación a las características o aspectos particulares descritos.

MODO(S) PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

I. Descripción general de varias modalidades

El desarrollo de plantas transgénicas se torna cada vez más complejo, y requiere típicamente almacenar múltiples transgenes en un único locus. Ver Xie *et al.* (2001) Nat. Biotechnol 19(7):677-9. Dado que cada transgén requiere usualmente un promotor único para su expresión, se requieren múltiples promotores para expresar diferentes transgenes dentro de un solo gen de almacenamiento. Además de incrementar el tamaño del gen de almacenamiento, esto conduce frecuentemente al uso repetido del mismo promotor para obtener niveles similares de patrones de expresión de transgenes diferentes. Este acercamiento es frecuentemente problemático, dado que la expresión de transgenes múltiples dirigida por el mismo promotor puede conducir al silenciamiento del gen o HBGS. Un exceso de sitios de unión al factor de transcripción (TF) en competencia, puede causar depleción de

los TF endógenos y conducir a regulación negativa transcripcional. El silenciamiento de transgenes no es deseado para el funcionamiento de una planta transgénica producida para expresar los transgenes. Las secuencias repetitivas dentro de un transgén conducen frecuentemente a la recombinación de homólogos intralocus, lo que resulta en la redistribución de polinucleótidos y fenotipos o funcionamientos agronómicos no deseados.

Los promotores vegetales que se usan en la investigación básica o aplicación biotecnológica son generalmente unidireccionales, y regulan sólo un gen que se une a su extremo 3' (corriente abajo). Para producir plantas transgénicas con varias características o rasgos, sería de utilidad reducir el número de promotores que se implementan para conducir la expresión de los transgenes que codifican las características y rasgos deseados. Especialmente en aplicaciones donde es necesario introducir transgenes múltiples en plantas para la ingeniería metabólica o almacenamiento de rasgos, necesitando por lo tanto promotores múltiples para conducir la expresión de transgenes múltiples. Mediante el desarrollo de un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz único, que puede conducir la expresión de dos transgenes a ambos lados del promotor, puede reducirse el número total de promotores que se necesitan para el desarrollo de cultivos transgénicos, lo que permite de este modo el uso repetido del mismo promotor, lo que reduce el tamaño de los constructos transgénicos, y/o reduce la posibilidad de HBGS. Dicho promotor puede generarse al introducir elementos *cis* conocidos en un stretch de ADN novedoso o sintético, o alternativamente mediante “intercambio de dominio”, donde los dominios de un promotor se reemplazan con dominios equivalentes funcionalmente a partir de otros promotores heterólogos.

Las modalidades en la presente utilizan un proceso donde un promotor unidireccional a partir de un gen ubiquitina 3 de *Oryza sativa* (Arroz) (por ejemplo, Rubi3) se usó para diseñar un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 de arroz, de modo que tal promotor puede dirigir la expresión de dos genes, uno a cada extremo del promotor. Los promotores bidireccionales sintéticos de ubiquitina 3 del arroz pueden permitir a los expertos en la técnica almacenar transgenes en células vegetales y plantas, al permitir el uso repetido del mismo promotor y reducir el tamaño de los constructos transgénicos. Más aún, la regulación de la expresión de dos genes con un único promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz, puede proporcionar también la capacidad de coexpresar los dos genes en las mismas condiciones, lo cual puede ser útil, por ejemplo, cuando los dos genes contribuyen cada uno a un rasgo único en el huésped. El uso de la función bidireccional de los promotores en plantas se ha reportado en algunos casos, lo que incluye el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays* (Publicación de Patente Internacional núm. WO2013101343 A1), promotores CaMV 35

(Barfield y Pua (1991) Plant Cell Rep. 10(6-7):308-14; Xie et al (2001), *supra*), y el promotor *mas* (Velten et al (1984) EMBO J. 3(12): 2723-30; Langridge et al (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:3219-23).

La iniciación de la transcripción y la modulación de la expresión génica en los genes vegetales se dirigen por una variedad de elementos de secuencia de ADN que se disponen colectivamente dentro del promotor. Los promotores eucariotas consisten en un elemento promotor de núcleo mínimo (minP), y secuencias reguladoras adicionales corriente arriba (URSs). El elemento promotor de núcleo es un estiramiento mínimo de secuencias de ADN contiguas que es suficiente para dirigir la iniciación precisa de la transcripción. Los promotores de núcleo en plantas también comprenden regiones canónicas asociadas con la iniciación de la transcripción, tal como cajas CAAT y TATA. El elemento de caja TATA se encuentra usualmente aproximadamente de 20 a 35 nucleótidos corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción.

La activación de la minP depende de la URS, a la cual se unen varias proteínas y, posteriormente, interactúan con el complejo de iniciación de la transcripción. Las URS comprenden secuencias de ADN, lo que determina el patrón de expresión espaciotemporal de un promotor que comprende la URS. La polaridad de un promotor se determina a menudo por la orientación de la minP, mientras que la URS es bipolar (es decir, funciona independientemente de su orientación).

En ejemplos específicos de algunas modalidades, un elemento promotor de núcleo mínimo (minUbi10P) de un promotor modificado de ubiquitina 1 de *Zea mays* (ZmUbi1) derivado originalmente de *Zea mays*, se utiliza para diseñar un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz que funciona en plantas para proporcionar características de control de la expresión que son únicas con respecto a los promotores bidireccionales descritos anteriormente. Las modalidades incluyen un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz que incluye además una secuencia de nucleótidos del elemento promotor de núcleo mínimo derivada de un promotor nativo de ubiquitina 1 de *Zea mays* (minPZmUbi1).

El promotor ZmUbi1 derivado originalmente de *Zea mays* c.v. B73 comprende secuencias localizadas en el genoma del maíz dentro de aproximadamente 899 bases en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción, y después dentro de aproximadamente 1093 bases en dirección 3' del sitio de inicio de la transcripción. Christensen *et al.* (1992) Plant Mol. Biol. 18(4):675-89 (que describe un gen *Zea mays* c.v. B73 ZmUbi1). Un promotor ZmUbi1 modificado derivado de b73 que se utiliza en algunos ejemplos es un promotor de aproximadamente 2 kb que contiene una caja TATA; dos elementos de consenso de choque térmico solapados; una secuencia líder de 82 o 83 nucleótidos (en dependencia de

- la hebra de referencia) inmediatamente adyacente al sitio de inicio de la transcripción, que se refiere en la presente como exón ZmUbi1; y un intrón de 1015 - 1016 nucleótidos. Otras variantes del promotor de ubiquitina de maíz que se derivan de la especie *Zea* y de genotipos *Zea mays*, pueden exhibir una alta conservación de secuencia alrededor del elemento minP que consiste en el elemento
- 5 TATA y los elementos de consenso de choque térmico en corriente ascendente. Por lo tanto, las modalidades de la invención se ejemplifican mediante el uso de esta (-200 nt) región corta muy conservada {por ejemplo, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2) de un promotor ZmUbi1 como un elemento promotor de núcleo mínimo para la construcción de promotores de plantas sintéticos bidireccionales.
- 10 El promotor de ubiquitina 3 del arroz derivado originalmente de *Oryza sativa* comprende secuencias localizadas en el genoma del arroz dentro de aproximadamente 1.990 bases en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción. E Sivamani, y R Qu (2006) Expression enhancement of a rice polyubiquitin promoter. Plant Molecular Biology 60:225-239. Un promotor de ubiquitina 3 del arroz modificado, derivado de *Oryza sativa* que se utiliza en algunos ejemplos es un promotor de aproximadamente 2 kb
- 15 que contiene una caja TATA, una secuencia 5' UTR/intrón, y un elemento potenciador situado corriente arriba en el inicio de la secuencia de codificación de la ubiquitina 3 del arroz. Otras variantes de promotores de ubiquitina 3 del arroz derivados de especies oryza y el genotipo *Oryza sativa* pueden exhibir una alta conservación de secuencia alrededor de estos elementos promotores.

II. Abreviaturas

- 20 AtUbi10 Ubiquitina 10 de Arabidopsis thaliana
 BCA ácido bicinonínico
 CaMV virus mosaico de la coliflor
 CsVMV virus del mosaico de la vena de yuca
 CTP Péptido de tránsito al cloroplasto
- 25 HBGS silenciamiento de genes basado en homología
 minUbi1P promotor de núcleo mínimo ZmUbi1
 OLA amplificación de oligo ligadura
 PCR Reacción en cadena de la polimerasa
 RCA amplificación por círculo rodante
- 30 RUbi3 Ubiquitina 3 de arroz
 RT-PCR PCR transcriptasa inversa
 SNuPE extensión del cebador de nucleótido único

URS secuencia reguladora corriente arriba

ZmUbi1 Ubiquitina 1 de *Zea Mays*

III. Condiciones

A través de la solicitud, se utilizan una serie de términos. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de la descripción y las reivindicaciones, incluyendo el alcance a darse a tales términos, se proporcionan las definiciones siguientes:

Intrones: Como se usa en la presente, el término "intrón" se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico comprendida en un gen (o secuencia de polinucleótidos expresada de interés) que se transcribe pero no se traduce. Los intrones incluyen la secuencia no traducida de ácido nucleico dentro de una secuencia de expresada de ADN, así como la secuencia correspondiente en moléculas de ARN transcritas de la misma.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o proteína) se ha separado sustancialmente, producido aparte de, o purificado a partir de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente se encuentra naturalmente {es decir, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, y proteínas), mientras produce un cambio químico o funcional en el componente (por ejemplo, un ácido nucleico puede aislarse de un cromosoma por la ruptura de enlaces químicos que conectan el ácido nucleico al ADN en el cromosoma). Las moléculas de ácido nucleico y proteínas que se han "aislado" incluyen moléculas de ácido nucleicos y proteínas purificados mediante métodos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados por expresión recombinante en una célula huésped, así como moléculas de ácido nucleico, proteínas, y péptidos sintetizados químicamente.

Expresión génica: Proceso por el cual la información codificada de una unidad transcripcional de ácido nucleico (que incluye, por ejemplo, ADN genómico) se convierte en una parte operativa, no operativa, o estructural de una célula, lo que incluye frecuentemente la síntesis de una proteína. La expresión génica puede influenciarse por señales externas; por ejemplo, la exposición de una célula, tejido u organismo de un agente que aumenta o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen también puede regularse en cualquier punto de la vía de ADN a ARN a proteína. La regulación de la expresión génica se produce, por ejemplo, a través de acciones de control que actúan sobre la transcripción, traducción, transporte y procesamiento de ARN, la degradación de moléculas intermediarias tal como ARNm, o a través de la activación, inactivación, compartimentalización, o la degradación de moléculas de proteínas específicas después de producidas, o por combinaciones de los mismos. La expresión génica puede medirse en el nivel de ARN o el nivel de proteínas por cualquier

método conocido en la técnica, que incluye, sin limitación, Northern blot, RT-PCR, Western blot, o ensayo(s) de actividad de la proteína *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*.

Silenciamiento génico basado en homología: Como se usa en la presente, "silenciamiento génico basado en homología" (HBGS) es un término genérico que incluye tanto el silenciamiento génico transcripcional y silenciamiento génico postranscripcional. El silenciamiento de locus objetivo por un locus de silenciamiento no enlazado puede resultar de la inhibición de la transcripción (silenciamiento génico transcripcional; TGS) o la degradación del ARNm (silenciamiento génico postranscripcional; PTGS), debido a la producción de ARN de doble cadena (ARNdh) correspondiente al promotor o secuencias transcritas, respectivamente. La participación de los componentes celulares diferentes en cada proceso sugiere que TGS y PTGS inducidos por ARN de doble cadena parecen resultar de la diversificación de un mecanismo común antiguo. Sin embargo, una comparación estricta de TGS y PTGS ha sido difícil de lograr debido a que se basa generalmente en el análisis de un loci de silenciamiento diferente. Describimos un único locus del transgén que desencadena tanto TGS y PTGS, debido a la producción de ARNdh que corresponde al promotor y secuencias transcritas de diferentes genes objetivo. Mourrain *et al.* (2007) Planta 225:365-79. Es probable que los ARNip sean las moléculas verdaderas que desencadenan TGS y PTGS en secuencias homólogas: en este modelo los ARNip desencadenarían el silenciamiento y la metilación de secuencias homólogas en *cis* y en *trans* a través de la difusión de la metilación de las secuencias de transgén en el promotor endógeno.

Id.

Molécula de ácido nucleico. Como se usa en la presente, el término "molécula de ácido nucleico" (o "ácido nucleico" o "polinucleótido") puede referirse a una forma polimérica de nucleótidos, que puede incluir tanto hebras sentido y antisentido de ARN, ADNc, ADN genómico, y formas sintéticas y polímeros mixtos de los anteriores. Un nucleótido puede referirse a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido, o una forma de modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una "molécula de ácido nucleico", como se usa en la presente, es sinónimo de "ácido nucleico" y "polinucleótido". Una molécula de ácido nucleico es por lo general, de al menos 10 bases de longitud, a menos que se especifique lo contrario. El término puede referirse a una molécula de ARN o ADN de longitud indeterminada. El término incluye formas de cadena de ADN simple y doble. Una molécula de ácido nucleico puede incluir uno de o ambos nucleótidos modificados o de origen natural, unidos entre sí por uniones de nucleótidos de origen natural y/o de origen no natural.

Las moléculas de ácido nucleico pueden modificarse químicamente o bioquímicamente, o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, como resultará fácilmente apreciado por los

- expertos en la técnica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótidos (por ejemplo, enlaces no cargados: por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc; enlaces cargados: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc; restos pendientes: por ejemplo, péptidos; intercaladores: por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.; quelantes; alquilantes; y enlaces modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). El término "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier conformación topológica, lo que incluye conformaciones de cadena sencilla, de doble cadena, parcialmente duplicadas, parcialmente triplicadas, de horquilla, circulares y candados.
- La transcripción procede en dirección 5' a 3' a lo largo de una cadena de ADN. Esto significa que el ARN se produce mediante la adición secuencial de ribonucleótido-5'-trifosfatos al extremo 3' de la cadena en crecimiento (con el requisito de eliminación del pirofosfato). Tanto en una molécula de ácido nucleico lineal o circular, los elementos discretos (por ejemplo, secuencias de nucleótidos particulares) pueden referirse como "corriente arriba" o "5'" en relación con un elemento adicional si se unen o se unirán al mismo ácido nucleico en la dirección 5' a partir de ese elemento. Del mismo modo, los elementos discretos pueden estar "corriente abajo" o "3'" en relación con un elemento adicional si se une o se unirá al ácido nucleico mismo en la dirección 3' a partir de ese elemento.
- La "posición" de la base, como se usa en la presente, se refiere a la localización de una base dada o residuo de nucleótidos dentro de un ácido nucleico designado. El ácido nucleico designado puede definirse por la alineación (ver más adelante) con un ácido nucleico de referencia.
- Hibridación: Los oligonucleótidos y sus análogos se hibridan por enlaces de hidrógeno, que incluye Watson-Crick, unión de hidrógeno Hoogsteen o Hoogsteen invertida, entre las bases complementarias. Generalmente, las moléculas de ácido nucleico consisten en bases nitrogenadas que son pirimidinas (citosina (C), uracilo (U) y timina (T)) o purinas (adenina (A) y guanina (G)). Estas bases nitrogenadas forman enlaces de hidrógeno entre una pirimidina y una purina, y la unión de la pirimidina a la purina se refiere como "apareamiento de bases". Más específicamente, A se unirá por enlaces de hidrógeno a T o U, y G se une a C. "Complementaria" se refiere al apareamiento de bases que se produce entre dos secuencias diferentes de ácidos nucleicos o dos regiones diferentes de la misma secuencia de ácido nucleico.
- "Específicamente hibridable" y "específicamente complementario" son términos que indican un grado suficiente de complementariedad de manera que se produce una unión estable y específica entre el oligonucleótido y el ADN o ARN. El oligonucleótido no necesita ser 100 % complementario a su

secuencia objetivo para ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la molécula de ADN o ARN objetivo interfiere con la función normal del ADN o ARN objetivo, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido a las secuencias no objetivo, en las condiciones
5 donde se desea una unión específica, por ejemplo, en las condiciones fisiológicas en el caso de ensayos o sistemas *in vivo*. Tal unión se refiere como hibridación específica.

Las condiciones de hibridación que resultan en grados particulares de rigurosidad variarán en dependencia de la naturaleza del método de hibridación elegido y de la composición y longitud de las secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan. Generalmente, la temperatura de hibridación y la
10 fuerza iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{2+}) del tampón de hibridación contribuirán a la rigurosidad de la hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen en la rigurosidad. Los cálculos relativos a las condiciones de hibridación requeridas para la consecución de determinados grados de rigurosidad se analizan en Sambrook et al. (Ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Clonación Molecular: un Manual de Laboratorio], 2ª edición, vol. 1-3, Cold
15 Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, caps. 9 y 11.

Como se usa en la presente, las "condiciones rigurosas" abarcan las condiciones en las que sólo se producirá hibridación si hay menos de 50 % de falta de coincidencia entre la molécula de hibridación y ADN objetivo. Las "condiciones rigurosas" incluyen más niveles particulares de rigurosidad. Por lo tanto, como se usa en la presente, las condiciones de "rigurosidad moderada" son aquellas en las
20 cuales las moléculas con más de 50% de falta de coincidencia en la secuencia no se hibridarán; las condiciones de "alta rigurosidad" son aquellas en las cuales las secuencias con más de 20% de falta de coincidencia no se hibridarán; y las condiciones de "muy alta rigurosidad" son aquellas en las cuales las secuencias con más de 10 % de falta de coincidencia no se hibridarán.

En modalidades particulares, las condiciones rigurosas pueden incluir hibridación a 65 °C, seguida
25 por lavados a 65 °C con SSC 0,1x/SDS 0,1 % durante 40 minutos.

Las siguientes son condiciones de hibridación representativas, pero no limitantes.

Rigurosidad muy alta: 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 uno; y lavar dos veces en tampón SSC 0,5x a 65 °C durante 20 minutos cada uno.

30 Alta rigurosidad: 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 uno; y lavar dos veces en tampón SSC 1x a 55-70 °C durante 30 minutos cada uno.

Rigurosidad Moderada: 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 uno.

En modalidades particulares, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridables pueden permanecer unidas en condiciones de hibridación de rigurosidad muy alta. En estas y otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridables pueden permanecer unidas en condiciones de hibridación de alta rigurosidad. En estas y otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridables pueden permanecer unidas bajo condiciones de hibridación de rigurosidad moderada.

Oligonucleótido: Un oligonucleótido es un polímero de ácido nucleico corto. Los oligonucleótidos pueden formarse por la escisión de segmentos de ácido nucleico más largos, o mediante la polimerización de precursores individuales de nucleótidos. Los sintetizadores automatizados permiten la síntesis de oligonucleótidos de hasta varios cientos de pares de bases de longitud. Debido a que los oligonucleótidos pueden unirse a una secuencia de nucleótidos complementaria, pueden usarse como sondas para la detección de ADN o ARN. Los oligonucleótidos compuestos de ADN (oligodesoxirribonucleótidos) pueden usarse en la PCR, una técnica para la amplificación de secuencias de ADN pequeñas. En la PCR, el oligonucleótido se refiere típicamente como un "cebador", lo que permite que una ADN polimerasa extienda el oligonucleótido y replique la cadena complementaria.

Identidad de secuencia: el término "identidad de secuencia" o "identidad", como se usa en la presente, en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, puede referirse a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación especificada.

Como se usa en la presente, el término "porcentaje de identidad de secuencia" puede referirse al valor determinado mediante la comparación de dos secuencias alineadas de manera óptima (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos, y secuencias de aminoácidos) sobre una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante la determinación del número de posiciones en las que el residuo de nucleótidos o aminoácidos idénticos está presente en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, al dividir el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la

ventana de comparación, y al multiplicar el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Los métodos para la alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. Diversos programas y algoritmos de alineación se describen en, por ejemplo: Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443; Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 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.* (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 alineación de secuencias y cálculos de homología puede encontrarse, por ejemplo, en Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10.

La Herramienta Básica de Alineación de Búsqueda Local (BLAST; Altschul *et al.* (1990)) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) se halla disponible en varias fuentes, que incluye el Centro Nacional de Información Biotecnológica (Bethesda, MD), y en internet, para su uso en relación con varios programas de análisis de secuencia. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia con el uso de este programa se halla disponible en un programa de internet, en la sección de "ayuda" para BLAST. Para las comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, la función "secuencias de Blast 2" del programa BLAST (Blastn) puede emplearse con el uso de los parámetros por defecto. Las secuencias de ácido nucleico con aún mayor similitud con las secuencias de referencia mostrarán un aumento del porcentaje de identidad al evaluarse por este método.

Unido operativamente: Una primera secuencia de ácido nucleico se une operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico, cuando la primera secuencia de ácido nucleico se halla en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor se encuentra unido operativamente con una secuencia codificante cuando el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Cuando se producen de forma recombinante, las secuencias de ácido nucleico unidas operativamente son generalmente contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los elementos no necesitan ser contiguos para unirse operativamente.

Promotor: Una región de ADN que generalmente se encuentra corriente arriba (hacia la región 5' de un gen) que se necesita para la transcripción. Los promotores pueden permitir la activación correcta o represión del gen que ellos controlan. Un promotor puede contener secuencias específicas que son reconocidas por factores de transcripción. Estos factores pueden unirse a la secuencia de ADN de un

promotor y resultar en el reclutamiento de la ARN polimerasa, una enzima que sintetiza el ARN a partir de la región codificante del gen.

Transformada: Una célula es "transformada" por una molécula de ácido nucleico transducida en la célula cuando la molécula de ácido nucleico se replica de forma estable por la célula, ya sea por la
5 incorporación de la molécula de ácido nucleico en el genoma celular o mediante replicación episomal. Como se usa en la presente, el término "transformación" abarca todas las técnicas mediante las cuales una molécula de ácido nucleico puede introducirse en dicha célula. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: la transfección con vectores virales; transformación con vectores plásmidos; electroporación (Fromm *et al.* (1986) *Nature* 319:791-3); lipofección (Felgner *et al.* (1987) *Proc Natl Acad Sci USA*.
10 84:7413-7); microinyección (Mueller *et al.* (1978) *Cell* 15:579-85); transferencia mediada por *Agrobacterium* (Fraley *et al.* (1983) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 80:4803-7); captación directa de ADN; transformación mediada por Whiskers (fibras de carburo de silicio); y bombardeo de microprojectiles (Klein *et al.* (1987) *Nature* 327:70).

Transgén: Una secuencia de ácido nucleico exógena. A modo de ejemplo, un transgén es una
15 secuencia de genes (por ejemplo, un gen de resistencia a los herbicidas), un gen que codifica un compuesto industrialmente o farmacéuticamente útil, o un gen que codifica un rasgo agrícola deseable. En otro ejemplo, el transgén es una secuencia de ácido nucleico antisentido, en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico antisentido inhibe la expresión de una secuencia de ácido nucleico objetivo. Un transgén puede contener secuencias reguladoras unidas operativamente al
20 transgén (por ejemplo, un promotor). En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de interés es un transgén. Sin embargo, en otras modalidades, una secuencia de polinucleótido de interés es una secuencia de ácido nucleico endógena, donde se desean copias genómicas adicionales de la secuencia de ácido nucleico endógena, o una secuencia de polinucleótido que presenta orientación antisentido con respecto a la secuencia de una molécula de ácido nucleico objetivo en el organismo
25 huésped.

Evento transgénico: un "evento" transgénico se produce por la transformación de células vegetales con ADN heterólogo, es decir, una constructo de ácido nucleico que incluye un transgén de interés, la regeneración de una población de plantas que resultan de la inserción del transgén en el genoma de la planta, y la selección de una planta en particular caracterizads por la inserción en una ubicación
30 particular del genoma. El término "evento" se refiere al transformante original, y la progenie del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término "evento" se refiere también a la progenie producida por un cruzamiento lejano sexual entre el transformante y otra variedad que incluye el

ADN genómico/transgén. Aún después de retrocruzamientos repetidos de un parental recurrente, el transgén de ADN insertado y el ADN genómico que lo flanquea (ADN genómico/transgén) a partir del pariente transformado está presente en la progenie del cruce en la misma localización cromosómica. El término "evento" también se refiere al ADN a partir del transformante original, y la progenie del mismo que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica que lo flanquea inmediatamente adyacente al ADN insertado que se esperaría se transfiera a una progenie que reciba el ADN insertado, que incluye el transgén de interés como resultado de un cruce sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original, y la progenie resultante del mismo) y una línea parental que no contiene el ADN insertado.

Vector: Una molécula de ácido nucleico introducida en una célula, que produce una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en la célula huésped, tal como un origen de replicación. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un plásmido, cósmido, bacteriófago, o virus que porta el ADN exógeno en una célula. Un vector también puede incluir uno o más genes, 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 que causa que la célula expresa las moléculas de ácido nucleico y/o proteínas codificadas por el vector. Un vector puede incluir opcionalmente materiales para ayudar en la consecución de la entrada de la molécula de ácido nucleico en la célula (por ejemplo, un liposoma, codificación de proteínas, etc.).

A menos que se explique de otra manera específicamente, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece esta descripción. Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse, por ejemplo, en: Lewin, Genes V, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*: VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Como se usa en la presente, los artículos "un", "una" y "el/la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente y sin ambigüedad lo contrario.

IV. Promotor sintético bidireccional, RUBi3, y los ácidos nucleicos que comprenden el mismo

Esta descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos sintética que puede funcionar como un promotor bidireccional. En algunas modalidades, un promotor sintético bidireccional puede unirse operativamente a una o dos secuencias (de

polinucleótidos de interés. Por ejemplo, el promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz puede unirse operativamente a una o dos secuencias de polinucleótidos de interés que codifican un gen (por ejemplo, dos genes, uno a cada extremo del promotor), para regular la transcripción de al menos una (por ejemplo, una o ambas) secuencia(s) de nucleótidos de interés. En algunas modalidades, mediante la incorporación de una URS a partir de un promotor de ubiquitina 3 del arroz en el promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz, puede lograrse la expresión particular y los patrones de regulación (por ejemplo, tal como se exhiben por los genes bajo el control del promotor de ubiquitina 3 del arroz) con respecto a una secuencia de polinucleótidos de interés unida operativamente al promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz.

Algunas modalidades de la invención se ejemplifican en el presente mediante la incorporación de un elemento promotor de núcleo mínimo a partir de un promotor de un gen unidireccional de ubiquitina 1 de maíz (ZmUbi1) en un contexto molecular diferente de aquel del promotor nativo para diseñar un promotor bidireccional sintético. Este elemento promotor de núcleo mínimo se refiere en la presente como "minUbi1P", y es de aproximadamente 200 nt de longitud. La secuenciación y análisis de los elementos minUbi1P de múltiples de la especie *Zea* y genotipos *Zea mays* ha puesto de manifiesto que los elementos funcionales minUbi1P están muy conservados, de manera que un elemento de minUbi1P puede preservar su función como un iniciador de la transcripción si comparte, por ejemplo, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, y/o al menos aproximadamente 100 % de identidad de secuencia con la elemento minUbi1P de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2. Las características de los elementos minUbi1P que pueden ser útiles en algunas modalidades de la invención pueden incluir, por ejemplo, y sin limitación, la alta conservación de secuencia de nucleótidos mencionada anteriormente, la presencia de al menos una caja TATA, y/o la presencia de al menos un (por ejemplo, dos) elemento(s) de consenso de choque térmico. En elementos minUbi1P particulares, más de un elemento de consenso de choque térmico puede superponerse dentro de la secuencia minubi1P.

En modalidades, el proceso de incorporación de un elemento minUbi1P en un contexto molecular diferente de aquel del promotor nativo {es decir, ubiquitina 3 del arroz} para diseñar un promotor sintético bidireccional puede comprender la incorporación del elemento minUbi1P en un ácido

nucleico promotor de ubiquitina 3 del arroz, mientras que se invierte la orientación del elemento minUbi1P con respecto a la secuencia restante del promotor de ubiquitina 3 del arroz. Por lo tanto, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz puede comprender un elemento promotor de núcleo mínimo minUbi1P situado en dirección 3' de, y en orientación inversa con respecto a, una
5 secuencia de nucleótidos del promotor de ubiquitina 3 del arroz, de manera que puede unirse operativamente a una secuencia de nucleótido de interés localizada en dirección 3' de la secuencia de nucleótidos del promotor de ubiquitina 3 del arroz. Por ejemplo, el elemento minUbi1P puede incorporarse en el extremo 3' de un promotor de ubiquitina 3 del arroz en orientación inversa.

Un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz también puede comprender uno o más
10 elementos de secuencia adicionales además de un elemento minUbi1P y elementos de un promotor nativo de ubiquitina 3 del arroz. En algunas modalidades, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz puede comprender un promotor URS, un exón (por ejemplo, un péptido líder o de señal), un intrón, una secuencia espaciadora, y/o combinaciones de uno o más de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo y sin limitación, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz
15 puede comprender una secuencia URS de un promotor de ubiquitina 3 del arroz o de ZmUbi1, un intrón de un gen de ubiquitina 3 del arroz o de ZmUbi1, un exón que codifica un péptido líder de un gen de ubiquitina 3 del arroz o de ZmUbi1, un intrón de un gen de ubiquitina 3 del arroz o de ZmUbi1, y combinaciones de estos.

Un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz también puede comprender uno o más
20 elementos de secuencia adicionales además de un elemento minUbi1P y elementos de un promotor nativo de ubiquitina 3 del arroz que incluye el minUbi1P. En algunas modalidades, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz puede comprender un promotor URS, un exón (por ejemplo, un péptido líder o de señal), un intrón, una secuencia espaciadora, y/o combinaciones de uno o más de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo y sin limitación, un promotor bidireccional
25 sintético de ubiquitina 3 del arroz puede comprender una secuencia URS de un promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays*, un intrón de un gen ADH, un exón que codifica un péptido líder de un gen de ubiquitina de *Zea mays*, un intrón de un gen de Ubiquitina de *Zea mays*, y combinaciones de estos.

En algunas modalidades de un promotor que comprende un promotor URS, el URS puede seleccionarse para conferir propiedades reguladoras particulares en el promotor sintético. Los
30 promotores conocidos varían ampliamente en el tipo de control que ejercen sobre los genes unidos operativamente (por ejemplo, las respuestas medioambientales, señales de desarrollo, y la información espacial), y un URS incorporado en un promotor heterólogo normalmente mantiene el tipo de control

que exhibe el URS con respecto a su promotor nativo y el/los gen(es) unido operativamente. Langridge et al. (1989), *supra*. Ejemplos de los promotores eucarióticos que han sido caracterizados y pueden contener un URS comprendido dentro de un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz, de acuerdo con algunas modalidades incluyen, por ejemplo y sin limitación: los promotores descritos en las patentes de invención estadounidenses núms. 6,437,217 (promotor RS81 de maíz); 5,641,876 (promotor de actina del arroz); 6,426,446 (promotor RS324 de maíz); 6,429,362 (promotor PR-1 de maíz); 6,232,26 (promotor A3 de maíz); 6,177,611 (promotores de maíz constitutivos); 6,433,252 (promotor de oleosina L3 de maíz); 6,429,357 (promotor de actina del arroz 2, e intrón actina 2 del arroz); 518371848 (promotor específico de la raíz); 6,294,714 (promotores inducibles por luz); 611401078 (promotores inducible 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 gamma-coixina); y solicitud de patente estadounidense núm. de serie 09/757,089 (promotor de aldolasa de cloroplasto de maíz).

Promotores procarióticos ilustrativos adicionales incluyen el promotor de la nopalina sintasa (NOS) (Ebert *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745-9); promotor de octopina sintasa (OCS) (que se porta en plásmidos inductores de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*); los promotores caulimovirus tales como el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV); (Lawton *et al.* (1987) Plant. Mol. Biol. 9:315-24) el promotor 35S de CaMV (Odell *et al.* (1985) Nature 313:810-2); el promotor 35S del virus del mosaico escrofularia (Walker et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84 (19):6624-8); el promotor de la sacarosa sintasa (Yang y Russell (1990) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 87: 4144-8); el promotor del complejo de genes R (Chandler *et al.* (1989) Plant Cell 1: 1175-1183); CaMV35S (patentes de invención estadounidense núms. 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196.); FMV35S (patente de invención estadounidense núm. 6,051,753, y 5.378.619); un promotor PC1SV (patente de invención estadounidense núm. 5,850,019); el promotor SCP1 (patente de invención estadounidense núm. 6,677,503); y promotores de *Agrobacterium tumefaciens* (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), y similares.

En algunas modalidades, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz puede comprender además un exón. Por ejemplo, puede desearse dirigir o traficar un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótido de interés unida operativamente al promotor a una ubicación subcelular y/o compartimento particular. En estas y otras modalidades, una secuencia codificante (exón) puede incorporarse en una molécula de ácido nucleico entre la secuencia restante de un

promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 de arroz y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido. Estos elementos pueden disponerse de acuerdo con el criterio del experto en la técnica de manera tal que el promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz promueve la expresión de un polipéptido (o uno o ambas de dos secuencias que codifican el polipéptido que se unen operativamente al promotor) que comprende el péptido codificado por la secuencia de codificación incorporada en una relación funcional con el resto del polipéptido. En ejemplos particulares, puede incorporarse un exón que codifica un péptido líder, tránsito, o de señal (por ejemplo, un péptido líder Ubi1 de *Zea mays*).

Los péptidos que pueden codificarse por un exón incorporado en un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 de arroz incluyen, por ejemplo y sin limitación: un péptido líder de ubiquitina (por ejemplo, Ubi1 de *Zea mays*), un péptido de tránsito al cloroplasto (CTP) (por ejemplo, el EPSPS CTP de *A. thaliana* (Klee *et al.* (1987) Mol. Gen. Genet. 210: 437-42), y la EPSPS CTP de *Petunia hybrida* (della-Cioppa *et al.* (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6873-7)), como se ejemplifica para el dirigido al cloroplasto de dicamba monooxigenasa (DMO) en la Publicación Internacional del PCT núm. WO 2008/105,890.

Los intrones también pueden incorporarse en un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 de arroz en algunas modalidades de la invención, por ejemplo, entre la secuencia restante del promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz y una secuencia de polinucleótidos de interés que se halla unido operativamente al promotor. En algunos ejemplos, un intrón incorporado en un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz puede ser, sin limitación, una UTR en dirección 5' que funciona como una secuencia líder de traducción que está presente en un ARNm completamente procesado que se encuentra en corriente abajo de la secuencia de inicio de traducción (tal secuencia líder de traducción puede afectar el procesamiento de un transcrito primario a ARNm, la estabilidad del ARNm, y/o la eficiencia de la traducción). Los ejemplos de secuencias líder de traducción incluyen las proteínas líderes de choque térmico de maíz y petunia (patente de invención estadounidense núm. 5,362,865), las proteínas líderes de recubrimiento de virus de plantas, líderes del rubisco de plantas, y otros. Ver, por ejemplo, Turner y Foster (1995) Molecular Biotech. 3(3):225-36. Los ejemplos no limitantes de UTR 5' incluyen GmHsp (patente de invención estadounidense núm. 5,659.122), PhDnaK (patente de invención estadounidense núm. 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). En ejemplos particulares, el intrón de la ubiquitina de *Zea mays* puede incorporarse en un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz.

Las secuencias adicionales que pueden incorporarse opcionalmente en un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz incluyen, por ejemplo y sin limitación: secuencias 3' no traducidas, regiones de terminación de la transcripción 3', y regiones de poliadenilación. Estos son elementos genéticos localizados corriente abajo de una secuencia de polinucleótidos de interés (por ejemplo, una
5 secuencia de interés unida operativamente a un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz), e incluyen polinucleótidos que proporcionan la señal de poliadenilación, y/u otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción, el procesamiento del ARNm, o la expresión génica. Una señal de poliadenilación puede funcionar en plantas para causar la adición de nucleótidos poliadenilados al extremo 3' de un precursor de ARNm. La secuencia de poliadenilación puede
10 derivarse del gen natural, de una variedad de genes de plantas, o de genes de ADN-T. Un ejemplo no limitante de una región terminación de transcripción 3' es la región 3' de la nopalina sintasa (3' nos; Fraley *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803-7). Un ejemplo de la utilización de diferentes regiones 3' no traducidas se provee en Ingelbrecht *et al.*, Plant Cell (1989) 1:671-80. Ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación incluyen las del gen de *Pisum sativum* RbcS2 (Ps.RbcS2-E9;
15 Coruzzi *et al.* (1984) EMBO J. 3:1671-9) y el gen Nos de *Agrobacterium tumefaciens* (Núm. de Acceso al GenBank E01312).

En algunas modalidades, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz comprende una o más secuencias de nucleótidos que facilitan la orientación de un ácido nucleico que comprende el promotor a un locus particular en el genoma del organismo objetivo. Por ejemplo, pueden incluirse
20 una o más secuencias que son homólogas a los segmentos de la secuencia de ADN genómico en el huésped (por ejemplo, secuencias de ADN genómico raras o únicas). En algunos ejemplos, estas secuencias homólogas pueden guiar la recombinación e integración de un ácido nucleico que comprende un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz en el sitio del ADN homólogo en el genoma del huésped. En ejemplos particulares, un promotor bidireccional sintético de
25 ubiquitina 3 del arroz comprende una o más secuencias de nucleótidos que facilitan la orientación de un ácido nucleico que comprende el promotor a una ubicación rara o única en un genoma huésped, mediante el uso de enzimas nucleasa modificadas genéticamente que reconocen la secuencia en la ubicación rara o descripción única de la ubicación y facilitan la integración en esa ubicación rara o
única. Tal sistema de integración objetivo que emplea endonucleasas de dedos de zinc como la enzima
30 nucleasa se describe en la solicitud de patente estadounidense núm. 13/011,735, el contenido de la cual se incorpora en su totalidad en la presente como esta referencia.

En otras modalidades, la divulgación incluye además como una modalidad la secuencia de polinucleótido de interés que comprende un rasgo. El rasgo puede ser un rasgo de resistencia a insecticida, rasgo de tolerancia a herbicida, rasgo de eficiencia del uso de nitrógeno, rasgo de eficiencia del uso del agua, rasgo de calidad nutricional, rasgo de unión a ADN, rasgo de un marcador seleccionable, y cualquier combinación de estos.

En modalidades adicionales los rasgos se integran dentro de la célula vegetal transgénica como un evento transgénico. En modalidades adicionales, el evento transgénico produce un producto básico. Por consiguiente, una composición se deriva de las células vegetales transgénicas de la descripción sujeto, donde dicha composición es un producto básico que se selecciona del grupo que consiste en sémola, harina, concentrado de proteína, o aceite. En modalidades adicionales, se incluyen los productos básicos producidos por plantas transgénicas que se derivan de células vegetales transformadas, donde los productos básicos comprenden una cantidad detectable de una secuencia de ácido nucleico de la invención. En algunas modalidades, tales productos básicos pueden producirse, por ejemplo, mediante la obtención de plantas transgénicas y la preparación de alimentos o piensos a partir de estos. Los productos básicos que comprenden una o más de las secuencias de ácido nucleico de la invención incluyen, por ejemplo y sin limitación: harinas, aceites, o granos triturados o enteros o semillas de una planta, y cualquier producto alimenticio que comprende cualquier harina, aceite, granos triturados o enteros de una planta o semilla recombinante que comprende una o más de las secuencias de ácido nucleico de la invención. La detección de una o más de las secuencias de la invención en uno o más de los productos o productos básicos es evidencia de facto de que el producto o producto básico se producen a partir de una planta transgénica diseñada para expresar uno o más rasgos agronómicos.

Los ácidos nucleicos que comprenden un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz pueden producirse con el uso de cualquier técnica conocida en la técnica, lo que incluye, por ejemplo y sin limitación: RCA, amplificación por PCR, amplificación por RT-PCR, OLA, y SNuPE. Estas y otras técnicas equivalentes son bien conocidas por los expertos en la técnica, y se describen adicionalmente en detalle en, por ejemplo y sin limitación: Sambrook *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001; y Ausubel *et al. Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1998. Todas las referencias citadas anteriormente, lo que incluye los dos manuales citados en este párrafo, se incorporan en la presente como referencia en su totalidad, lo que incluye cualquier dibujo, figuras y/o tablas proporcionadas en estas.

V. Suministro a una célula de una molécula de ácido nucleico que comprende el promotor bidireccional sintético RUBi3

La presente descripción también proporciona métodos para la transformación de una célula con una molécula de ácido nucleico que comprende un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz. Puede usarse cualquiera de un gran número de técnicas conocidas en la técnica para la introducción de moléculas de ácido nucleico en plantas, para transformar una planta con una molécula de ácido nucleico que comprende un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz, de conformidad con algunas modalidades, por ejemplo, para introducir uno o más promotores bidireccionales sintéticos de ubiquitina 3 del arroz en el genoma de la planta huésped, y/o para introducir además uno o más polinucleótidos de interés unidos operativamente al promotor.

Los métodos adecuados para la transformación de plantas incluyen cualquier método por el cual el ADN pueda introducirse en una célula, por ejemplo y sin limitación: electroporación (Ver, por ejemplo, la patente de invención estadounidense 5,384,253), bombardeo de microproyectiles (Ver, por ejemplo, las patentes de invención estadounidense 5,015,580, 5,550,318, 5,538,880, 6,160,208, 6,399,861, y 6,403,865), transformación mediada por *Agrobacterium* (Ver, por ejemplo, las patentes de invención estadounidense 5,635,055, 5,824,877, 5,591,616, 5,981,840, y 6,384,301), y transformación de protoplastos (Ver, por ejemplo, la patente de invención estadounidense 5,508,184). A través de la aplicación de técnicas como las anteriores, las células de prácticamente cualquier especie vegetal pueden transformarse de forma estable, y estas células pueden desarrollarse en plantas transgénicas mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las técnicas que pueden ser útiles particularmente en el contexto de la transformación de algodón se describen en las patentes de invención estadounidense 5,846,797, 5,159,135, 5,004,863, y 6,624,344; las técnicas para transformar plantas de *Brassica* en particular se describen, por ejemplo, en la patente de invención estadounidense 5,750,871; las técnicas para transformar la soja se describen, por ejemplo, en la patente de invención estadounidense 6,384,301; y las técnicas para transformar maíz se describen, por ejemplo, en las patentes de invención estadounidense 7,060,876 y 5,591,616, y la publicación internacional del PCT WO 95/06.722.

Después de efectuar la entrega de un ácido nucleico exógeno a una célula receptora, la célula transformada se identifica generalmente para el cultivo adicional y la regeneración de la planta. Para mejorar la capacidad para identificar transformantes, puede desearse emplear un gen marcador de selección o de cribado con el vector de transformación usado para generar el transformante. En este caso, la población de células potencialmente transformadas puede ensayarse mediante la exposición

de las células a un agente o agentes selectivos, o las células pueden cribarse para el rasgo del gen marcador deseado.

Las células que sobreviven a la exposición del agente selectivo, o células que han sido anotadas como positivas en un ensayo de cribado, pueden cultivarse en medios que soporten la regeneración de las plantas. En algunas modalidades, cualquier medio de cultivo de tejido vegetal adecuado (por ejemplo, los medios MS y N6) puede modificarse mediante la inclusión de otras sustancias, tales como reguladores de crecimiento. Los tejidos pueden mantenerse en un medio básico con reguladores de crecimiento hasta que una cantidad suficiente de tejido se encuentre disponible para comenzar los esfuerzos de regeneración de plantas, o después de rondas repetidas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración (por ejemplo, al menos 2 semanas), y después transferidos a medios que conducen a la formación de brotes. Los cultivos se transfieren periódicamente hasta que se produce una suficiente formación de brotes. Una vez que se forman los brotes, se transfieren a los medios que conducen a la formación de raíces. Una vez que se forman suficientes raíces, las plantas pueden transferirse al suelo para su posterior crecimiento y madurez.

Para confirmar la presencia de la molécula de ácido nucleico deseada que comprende un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz en las plantas que se regeneran, pueden llevarse a cabo una variedad de ensayos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo: ensayos biológicos moleculares, tal como Southern y Northern blot y PCR; ensayos bioquímicos, tal como detectar la presencia de un producto proteico, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y/o Western blot) o mediante función enzimática; ensayos de parte de la planta, tal como ensayos de hojas o de raíces; y el análisis del fenotipo de la planta regenerada en su totalidad.

Los eventos de integración objetivo pueden cribarse, por ejemplo, mediante amplificación por PCR con el uso, por ejemplo, de cebadores de oligonucleótidos específicos para moléculas de ácido nucleico de interés. Se entiende que el genotipado por PCR incluye, pero no se limita a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificación de ADN genómico derivado de tejido de callo de la planta huésped aislado, el cual se prevé que contiene una molécula de ácido nucleico de interés integrado en el genoma, seguido por la clonación estándar y análisis de secuencia de los productos de amplificación por PCR. Los métodos de genotipificación por PCR han sido bien descritos (ver, por ejemplo, Rios *et al.* (2002) Plant J. 32:243-53), y puede aplicarse a un ADN genómico derivado de cualquier especie vegetal o tipo de tejido, lo que incluye cultivos celulares. Las combinaciones de cebadores de oligonucleótidos que se unen tanto a la secuencia objetivo como a la secuencia introducida pueden utilizarse secuencialmente o multiplexados en reacciones de amplificación por

PCR. Pueden producirse cebadores de oligonucleótidos diseñados para hibridar con el sitio objetivo, secuencias de ácido nucleico introducidas, y/o combinaciones de los dos. Por lo tanto, las estrategias de genotipado por PCR pueden incluir, por ejemplo y sin limitación: la amplificación de secuencias específicas en el genoma de la planta, la amplificación de múltiples secuencias específicas en el genoma de la planta, la amplificación de secuencias no específicas en el genoma de la planta, y combinaciones de cualquiera de los anteriores. Un experto en la técnica puede idear combinaciones adicionales de cebadores y reacciones de amplificación para interrogar el genoma. Por ejemplo, puede diseñarse un conjunto de cebadores de oligonucleótidos directos e inversos para hibridarse con la(s) secuencia(s) de ácido nucleico específica(s) para el objetivo fuera de los límites de la secuencia de ácido nucleico introducida.

Pueden diseñarse cebadores de oligonucleótidos directos e inversos para hibridarse específicamente con una molécula de ácido nucleico introducida, por ejemplo, en una secuencia correspondiente a una región codificante dentro de una secuencia de polinucleótidos de interés comprendida en la misma, o en otras partes de la molécula de ácido nucleico. Estos cebadores pueden usarse en combinación con los cebadores descritos anteriormente. Los cebadores de oligonucleótidos pueden sintetizarse de conformidad con una secuencia deseada, y están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA). La amplificación puede seguirse por la clonación y secuenciación, o por análisis de secuencia directa de productos de amplificación. Un experto en la técnica podría imaginar métodos alternativos para el análisis de productos de amplificación generados durante el genotipado por PCR. En una modalidad, se emplean cebadores de oligonucleótidos específicos para el gen objetivo en amplificaciones por PCR.

VI. Células, cultivos celulares, tejidos y organismos que comprenden el promotor bidireccional sintético, RUBi3

Algunas modalidades de la presente invención también proporcionan células que comprenden un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz, por ejemplo, como puede presentarse en un constructo de ácido nucleico. En ejemplos particulares, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz de conformidad con algunas modalidades puede utilizarse como una secuencia reguladora para regular la expresión de los transgenes en células vegetales o plantas. En tales ejemplos, el uso de un promotor bidireccional sintético RUBi3 unido operativamente a una secuencia de polinucleótidos de interés (por ejemplo, un transgén) puede reducir el número de promotores homólogos necesarios para regular la expresión de un determinado número de secuencias de polinucleótidos de interés, y/o reducir el tamaño del(de los) constructo(s) de ácido nucleico

requerido(s) para introducir un número dado de secuencias de nucleótidos de interés. Además, el uso de un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz puede permitir la coexpresión de dos secuencias de nucleótidos de interés unidas operativamente en las mismas condiciones (es decir, las condiciones en que el promotor RUbi3 se halla activo). Tales ejemplos pueden ser particularmente
5 útiles, por ejemplo, cuando las dos secuencias de polinucleótidos de interés unidas operativamente contribuyen cada una a un único rasgo en un huésped transgénico que comprende las secuencias de nucleótidos de interés, y la coexpresión de las secuencias de nucleótidos de interés que impactan ventajosamente en la expresión del rasgo en el huésped transgénico.

En algunas modalidades, una planta transgénica que comprende uno o más promotores bidireccionales sintéticos de ubiquitina 3 del arroz y/o secuencias de nucleótidos de interés puede tener uno o más rasgos deseables conferidos (por ejemplo, introducidos, mejorados o que contribuyen a) por expresión de la(s) secuencia(s) de nucleótidos de interés en la planta. Tales rasgos pueden incluir, por ejemplo y sin limitación: la resistencia a los insectos, otras plagas y agentes causantes de enfermedades; tolerancia a herbicidas; estabilidad mejorada, rendimiento, o tiempo de conservación; tolerancia
15 ambiental; producción farmacéutica; producción de productos industriales; y mejoras nutricionales.

En algunos ejemplos, un rasgo deseable puede conferirse por transformación de una planta con una molécula de ácido nucleico que comprende un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz unido operativamente a una secuencia de polinucleótidos de interés. En algunos ejemplos, un rasgo deseable puede conferirse a una planta producida como una planta progenie a través del cultivo, cuyo rasgo puede conferirse por una o más secuencias de nucleótidos de interés unidas operativamente a un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz, que pasa a la planta desde una planta parental que comprende una secuencia de nucleótidos de interés unida operativamente a un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz.
20

Una planta transgénica de conformidad con algunas modalidades puede ser cualquier planta capaz de transformarse con una molécula de ácido nucleico de la invención, o de ser cultivada con una planta transformada con una molécula de ácido nucleico de la invención. Por consiguiente, la planta puede ser una dicotiledónea o monocotiledónea. Ejemplos no limitantes de plantas dicotiledóneas para su uso en algunos ejemplos incluyen: alfalfa, frijoles, brócoli, col, canola, zanahoria, coliflor, apio, col china, algodón, pepino, berenjena, lechuga, melón, guisante, pimiento, cacahuete, patata, calabaza, rábano, semilla de colza, espinacas, soja, calabacín, remolacha azucarera, girasol, tabaco, tomate y sandía. Ejemplos no limitantes de plantas monocotiledóneas para su uso en algunos ejemplos
30

incluyen: *Brachypodium*, maíz, cebolla, arroz, sorgo, trigo, centeno, mijo, caña de azúcar, avena, triticale, pasto varilla, y césped.

En algunas modalidades, una planta transgénica puede usarse o cultivarse de cualquier manera, donde se desea la presencia de un promotor bidireccional sintético de ubiquitina 3 del arroz y/o una
5 secuencia de polinucleótidos de interés unida operativamente. Por consiguiente, tales plantastransgénicas pueden modificarse genéticamente para, entre otras cosas, tener uno o más rasgos deseados o eventos transgénicos, al ser transformadas con moléculas de ácido nucleico de conformidad con la invención, y pueden cosecharse o cultivarse por cualquier método conocido por los expertos en la técnica.

10 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o modalidades particulares. Los ejemplos no deben interpretarse como para limitar la descripción a los ejemplos o modalidades ejemplificados.

EJEMPLOS

15 Ejemplo 1: Materiales y métodos

Preparación de la muestra y bioensayos

Varias moléculas de ARNdh (que incluyen aquellas correspondientes a la reg1 de *rpII33-1* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5), reg1 de *rpII33-2* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6), v1 de *rpII33-2* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7), y v2 de *rpII33-2* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8) se
20 sintetizaron y purificaron con el uso del estuche de ARNi T7 MEGAscript® T7 (LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad, CA) o el estuche de síntesis de ARN de alto y rápido rendimiento T7 "T7 Quick High Yield ARN Synthesis Kit" (NEW ENGLAND BIOLABS, Whitby, Ontario). Las moléculas de ARNdh purificadas se prepararon en el tampón de TE y todos los bioensayos contenían un tratamiento de control que consistía en este tampón, que sirvió como testigo de fondo para
25 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 un espectrómetro NANODROP™ 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Las muestras se sometieron a prueba para determinar la actividad de los insectos en bioensayos conducidos con larvas neonatas de insectos con una dieta artificial para insectos. Los huevos de WCR
30 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 InteRNational, 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 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 en una mortalidad y una inhibición del crecimiento sorprendente e inesperada 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 reunidos a los efectos de proporcionar secuencias de

genes objetivo candidatos para el control mediante la tecnología de protección de vegetales transgénicos con ARNi contra insectos.

En una ejemplificación, se aisló la totalidad del ARN de aproximadamente 0.9 gm de larvas enteras de WCR de primer instar; (4 a 5 días luego de la eclosión; mantenidos a 16 °C) y se purificaron con el 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 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 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 gránulo de ARN se lavó dos veces mediante vortex 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, el gránulo se dejó secar al aire durante 3 a 5 min, para luego disolverse 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 gm 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 que se procesó nuevamente.

La calidad del ARN se determinó haciendo pasar una fracción a través de 1 % de gel de agarosa. La solución de gel de agarosa se preparó con un tampón de TAE 10x sometido a autoclave (EDTA de Tris-acetato; 1x de concentración es 0.04 M Tris-acetato, 1 mM EDTA (sal de sodio del ácido tetraacético de etilendiamina), pH 8.0) diluida con agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato) en un recipiente sometido a autoclave. Se usó 1x de TAE como tampón de la 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 de TE (10 mM Tris HCl pH 7.0; 1 mM EDTA) y 10 µL de tampón de muestra de ARN (Novagen[®] Catálogo núm. 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 ADN normalizada a partir del ARN 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 con más de 50,000 cóntigos. Tanto las lecturas no ensambladas como también los cóntigos se convirtieron en bases de datos que pueden usarse con BLAST con el uso del programa públicamente disponible, FORMATDB (disponible en la 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 la secuencia 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 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 homólogas de *Diabrotica* identificadas en la búsqueda por medio de TBLASTN comprendían verdaderamente genes de *Diabrotica* o eran el mejor acierto para la secuencia de genes candidatos no pertenecientes a *Diabrotica* en las secuencias de *Diabrotica*. En unos pocos casos, era claro que los cóntigos de *Diabrotica* o las lecturas de secuencias no ensambladas seleccionadas por homología respecto de un gen candidato que no era de *Diabrotica* se superponían y que el ensamble de los cóntigos no había logrado estas superposiciones.

En esos casos, se utilizó 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 *rpII33* de *Diabrotica* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3) como genes que pueden conducir a la mortalidad de las plagas de coleópteros, la inhibición del crecimiento, inhibición del desarrollo y/o inhibición de la alimentación en WCR.

Los polinucleótidos de SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3 son novedosos. Las secuencias no se hallan proporcionadas en las bases de datos públicas y no se hallan descritas en la publicación de patente de invención internacional PCT núm. WO/2011/025860; Solicitud de patente de invención estadounidense núm. 20070124836; Solicitud de patente de invención estadounidense núm. 20090306189; Solicitud de patente de invención estadounidense núm. US20070050860; Solicitud de patente de invención estadounidense núm. 20100192265; Patente de invención estadounidense 7,612,194; o Solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2013192256. La *rpII33-1* de *Diabrotica* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1) se relaciona de alguna manera con un fragmento de una secuencia de *Drosophila willistoni* (núm. de acceso al GENBANK XM_002064757.1). No hubo ninguna secuencia de nucleótidos homóloga significativa al *rpII33-2* de *Diabrotica* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3) hallada en el GENBANK. La homóloga más cercana de la secuencia de aminoácidos de *rpII33-1* de *Diabrotica* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2) es una proteína de *Aedes aegypti* que tiene el núm. de acceso al GENBANK XP_001659470.1 (94 % similar; 87 % idéntica sobre la región de homología). La homóloga más cercana de la secuencia de aminoácidos de *RP133-2* de *Diabrotica* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4) es una proteína de *Dendroctonus ponderosae* que posee el núm. de acceso al GENBANK AAE63493.1 (96 % similar; 91 % idéntica sobre la región de homología).

Los transgenes de ARNdh de *RpII33* 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 que apunta a *rpII33* 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 *RpII33* 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 genes candidatos *rpII33* para generar amplicones por PCR para la síntesis de ARNd_h. Se diseñaron cebadores para amplificar porciones de las regiones codificantes de cada gen objetivo por PCR. Ver la Tabla 1. Cuando era adecuado, se incorporó una secuencia promotora de fagos T7 (TTAATACGACTCACTATAGGGAGA; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9) en los extremos 5' de las hebras amplificadas de sentido o antisentido. Ver la Tabla 1. Se extrajo todo el ARN del WCR con el uso de TRIzol[®] (Life Technologies, Grand Island, NY) y se utilizó luego 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 para amplificar la totalidad o parte de la secuencia génica objetivo nativa. Se amplificó también el ARNd_h a partir de un clon de ADN que comprendía la región codificante para una proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10; Shagin *et al.* (2004) Mol. Biol. Evol. 21(5):841-50).

Tabla 1. Cebadores y pares de cebadores utilizados para amplificar partes de regiones codificantes del gen objetivo *rpII-33* ilustrativo y el gen de control negativo de *YFP*.

	Id. del gen	Id. del cebador	Secuencia
20	Par 1 <i>rpII33-1</i> Reg1	Dvv-rpII33-1_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAATT CCTTGCCCATCGAATTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:11)
		Dvv-rpII33-1_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTATA TTCAGCTTCGTATTGATC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:12)
25	Par 2 <i>rpII33-2</i> Reg2	Dvv-rpII33-2_For	<i>TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTCTCAG TGATGAATTTTTCAGCAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:13)</i>
		Dvv-rpII33-2_Rev	<i>TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAGTTA TATGGAGCTTCATACTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:14)</i>

5	Par 3	<i>rpII33-2</i> <i>v1</i>	Dvv-rpII33-2 v1_For	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTTTAG ATGTAAAATGTACAGATG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:15)
			Dvv-rpII33-2 v1_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTGTTT CACCATACTCTGAG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:16)
10	Par 4	<i>rpII33-2</i> <i>v2</i>	Dvv-rpII33-2_v2_For	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAGCGTA TGCCAAAAAAGGCTTTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:17)
			Dvv-rpII33-2_v2_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAGGCCA TTCGTCTGGTTTAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:18)
15	Par 5	YFP	YFP-F_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGacaccatggg ctccagcggcgcgcc (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:26)
			YFP-R_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAagatcttgaa ggcgctcttcagg (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:29)

Ejemplo 4: Constructos de ARNi

20 Preparación de plantillas mediante PCR y síntesis del ARNd_h.

Se muestra en la Figura 1 una estrategia utilizada para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNd_h de *rpII33* e *YFP*. Los ADN plantilla deseados para usar en la síntesis del ARNd_h de *rpII33* 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 del ARN total aislado de huevos de WCR, 25 larvas de primer instar o adultos. Para cada región de genes objetivo *rpII33* y *YFP* seleccionada, las amplificaciones por PCR introdujeron una secuencia promotora T7 en los extremos 5' de las hebras amplificadas de sentido y antisentido (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 utilizó 30 como plantilla de transcripción para la producción de ARNd_h. Ver la FIG. 1. Las secuencias de las plantillas de ARNd_h amplificadas con los pares de cebadores particulares fueron: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5 (reg1 de *rpII33-1*), SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6 (reg1 de *rpII33-2*), SEC. CON

NÚM. DE IDENT.:7 (ver1 de *rpII33*-2), SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8 (v2 de *rpII33*-2), e YFP (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10). El ARN de doble hebra para el bioensayo de insectos se sintetizó y purificó con un estuche de ARNi Ambion® MEGAscript® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen) o el estuche de transcripción in vitro T7 HiScribe® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA). Las concentraciones de ARNdhs 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 génico objetivo para la formación de la horquilla que comprende el segmento de *rpII33* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76, o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78) 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 mediante transcritos primarios de ARN se facilita con la disposición (dentro de una única unidad de transcripción) de dos copias del segmento del gen objetivo *rpII33* 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.:107, y un intrón ST-LS1 (Vancanneyt *et al.* (1990) Mol. Gen. Genet. 220(2):245-50)). De este modo, el transcrito de ARNm primario contiene las dos secuencias de segmentos del gen *rpII33* como repeticiones invertidas grandes respecto una de la otra, separadas por la secuencia de intrones. Una copia de un promotor (por ejemplo, ubiquitina 1 del maíz, Patente de invención estadounidense núm. 5,510,474; 35S del virus mosaico del coliflor (CaMV); promotor de badnavirus baciliforme de la caña de azúcar (ScBV); promotores de genes de actina de arroz; promotores de ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 del maíz; promotor de ALS; promotor del gen faseolin; *cab*; *rubisco*; *LAT52*; *ZmI3*; y/o *apg*) se utiliza para conducir la producción del transcrito primario de horquilla de ARNm 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 invención estadounidense núm. 6,699,984), AtUbi10, AtEfl, o StPinII) se utiliza para terminar la transcripción del gen que expresa el ARN horquilla.

Los vectores de entrada pDAB126158 y pDAB126159 comprenden un constructo de *rpII33* (SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:103 y 104, respectivamente) que comprenden un segmento de *rpII33* (SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:7 y 8, respectivamente).

Los vectores de entrada descritos precedentemente se utilizan en reacciones de recombinación estándar GATEWAY® con un vector de destino binario típico para producir vectores de

transformación de la expresión de ARN horquilla de *rpII33* 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 invención estadounidense 7,838,733(B2), y Wright *et al.* (2010)

5 Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 107:20240-5) bajo la regulación de un promotor vegetal operable de (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 invención estadounidense 5,510,474)). Se posicionan una 5'UTR y un intrón entre el extremo 3' del segmento promotor y el
10 codón de inicio de la región codificante de *AAD-1*. Un fragmento que comprende una región no traducida 3' de un gen de lipasa de maíz (ZmLip 3'UTR; Patente de invención estadounidense 7,179,902) se utiliza para terminar la transcripción del mRNA de AAD-1.

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
15 herbicidas (ariloxialcanoato dioxigenasa; AAD-1 v3) (como se indicó precedentemente) bajo la regulación de la expresión del promotor de ubiquitina 1 del maíz (como se indicó precedentemente) y un fragmento que comprende una región no traducida 3' de un gen de lipasa de maíz (ZmLip 3'UTR; como se indicó precedentemente).

Ejemplo 5: Cribaje de genes objetivo candidatos

20 El ARNdh sintético diseñado para inhibir secuencias de genes objetivo identificadas en el Ejemplo 2 causaron 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 *rpII33-2*, v1 de *rpII33-2*, y v2 de *rpII33-2* resultaron cada una en la mortalidad y la
25 inhibición del crecimiento de las larvas del gusano de la raíz del maíz occidental. Las Tablas 2 y 3 muestran los resultados de los bioensayos de alimentación basados en la dieta de larvas de WCR luego de 9 días de exposición a estos ARNdh, así como también los resultados obtenidos con una muestra de control negativo de ARNdh preparada a partir de una región codificante de la proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10).

30 Tabla 2. Resultados de los ensayos de alimentación de dieta de ARNdh de *rpII33* obtenidos con larvas del gusano de la raíz del maíz occidental luego de 9 días de alimentación. El análisis ANOVA halló

diferencias considerables 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 Tukey-Kramer.

Nombre del gen	Dosis (ng/cm ²)	N	Media (% de mortalidad) ± SEM*	Media (IC) ± SEM
<i>rpII33-2 Reg1</i>	500	2	97.06±2.94 (A)	1.00±0.01 (A)
<i>rpII33-2 v1</i>	500	10	88.83±3.09 (A)	0.97±0.01 (A)
<i>rpII33-2 v2</i>	500	10	89.41±1.18 (A)	0.94±0.02 (A)
TE**	0	13	13.62±2.30 (B)	0.06±0.06 (B)
Agua	0	13	18.32±3.19 (B)	-0.03±0.07 (B)
YFP***	500	13	14.87±2.37 (B)	-0.04±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. Síntesis de la potencia oral del ARNdh de *rpII33* en larvas de WCR (ng/cm²).

Nombre del gen	CL ₅₀	Rango	IC ₅₀	Rango
<i>rpII33-2_v1</i>	6.63	8.80 - 11.57	7.03	3.57 - 13.84
<i>rpII33-2_v2</i>	15.84	20.6 - 26.77	15.76	8.38 - 29.64

Se sugirió anteriormente que ciertos genes de *Diabrotica* spp. pueden explotarse para el control de insectos mediado por ARNi. Ver la publicación de patente de invención estadounidense núm. 2007/0124836, que describe 906 secuencias, y la patente de invención estadounidense núm. 7,612,194, que describe 9,112 secuencias. Sin embargo, se determinó que muchos genes de los que se sugería que poseen utilidad para el control de insectos mediado por la iARN no son eficaces para controlar el género *Diabrotica*. Se determinó que las secuencias v1 de *rpII33-2*, v2 de *rpII33-2*, y reg1 de *rpII33-2* proveen cada una un control superior sorprendente e inesperado de *Diabrotica* en comparación con otros genes de los que se sugería que poseían utilidad para el control de insectos mediado por la iARN.

Por ejemplo, se sugirió en la patente de invención estadounidense 7,612,194 que la *anexina*, *beta espectralina 2*, y *mtRP-L4* eran eficaces en el control de insectos mediado por ARNi. La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:20 es la secuencia de ADN de la región 1 de *anexina* (Reg 1) y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:21 es la secuencia de ADN de la región 2 de *anexina* (Reg 2). La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:22 es la secuencia de ADN de la región 1 de *beta espectralina 2* (Reg 1) y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:23 es la secuencia de ADN de la región 2 de *beta espectralina 2* (Reg2). La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:24 es la secuencia de ADN de la región 1 de *mtRP-L4* (Reg 1) y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:25 es la secuencia de ADN de la región 2 de *mtRP-L4* (Reg 2). Se utilizó también una secuencia de YFP (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10) para producir ARNdh como control negativo.

Cada una de las secuencias mencionadas precedentemente se utilizó para producir ARNdh mediante los métodos del Ejemplo 3. La estrategia utilizada para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNdh se muestra en la FIG. 2. Los ADN plantilla destinados para 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 primer instar de WCR. (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 sentido. 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. Ver la FIG. 2. El ARN de doble hebra se sintetizó y purificó con un estuche de ARNi Ambion® MEGAscript® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Las concentraciones de 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 precedentemente. La Tabla 4 menciona las secuencias de los cebadores utilizados para producir la Reg1 de *anexina*, Reg2 de *anexina*, Reg1 de *beta espectralin 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 una exposición de 9 días a estas moléculas de ARNdh. Los bioensayos replicados demostraron que la ingestión de estos ARNdh resultaron 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 de TE, agua, o proteína YFP.

Tabla 4. Cebadores y pares de cebadores utilizados para amplificar partes de regiones codificantes de genes

	Gen (Región)	Id. del cebador	Secuencia
Par 6	YFP	YFP-F_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACACCATGG GCTCCAGCGGCGCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:26)
	YFP	YFP-R	AGATCTTGAAGGCGCTCTTCAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:27)
Par 7	YFP	YFP-F	CACCATGGGCTCCAGCGGCGCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:28)
	YFP	YFP-R_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGATCTTG AAGGCGCTCTTCAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:29)
Par 8	Anexina (Reg 1)	Ann-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAGCTCCAAC AGTGGTTCCTTATC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:30)
	Anexina (Reg 1)	Ann-R1	CTAATAATTCTTTTTTAATGTTTCCTGAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:31)
Par 9	Anexina (Reg 1)	Ann-F1	GCTCCAACAGTGGTTCCTTATC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:32)
	Anexina (Reg 1)	Ann-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTAATAAT TCTTTTTTAATGTTTCCTGAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:33)
Par 10	Anexina (Reg 2)	Ann-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGATTGTTACA AGCTGGAGAACTTCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:34)

		Anexina (Reg 2)	Ann-R2	CTTAACCAACAACGGCTAATAAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:35)
5	Par 11	Anexina (Reg 2)	Ann-F2	TTGTTACAAGCTGGAGAACTTCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:36)
		Anexina (Reg 2)	Ann-R2T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTTAACCA ACAACGGCTAATAAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:37)
10	Par 12	Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGATGTTG GCTGCATCTAGAGAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:38)
		Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-R1	GTCCATTCGTCCATCCACTGCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:39)
15	Par 13	Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-F1	AGATGTTGGCTGCATCTAGAGAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:40)
		Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAGTCCATTC GTCCATCCACTGCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:41)
20	Par 14	Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAGCAGATG AACACCAGCGAGAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:42)
		Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-R2	CTGGGCAGCTTCTTGTTTCCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:43)
25	Par 15	Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-F2	GCAGATGAACACCAGCGAGAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:44)
		Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-R2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTGGGCAG CTTCTTGTTTCCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:45)
30	Par 16	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGTGAAAT GTTAGCAAATATAACATCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:46)

	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-R1	ACCTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:47)
Par 17	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-F1	AGTGAAATGTTAGCAAATATAACATCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:48)
	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAACCTCTCA CTTCAAATCTTGACTTTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:49)
Par 18	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAGTCA AGATTTGAAGTGAGAGGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:50)
	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-R2	CTACAAATAAAACAAGAAGGACCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:51)
Par 19	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-F2	CAAAGTCAAGATTTGAAGTGAGAGGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:52)
	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-R2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTACAAAT AAAACAAGAAGGACCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:53)

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.

Nombre del gen	Dosis (ng/cm ²)	Peso medio de larva viva (mg)	Media del % de mortalidad	Media de la Inhibición del crecimiento
<i>annexin</i> -Reg 1	1,000	0.545	0	-0.262
<i>annexin</i> -Reg 2	1,000	0.565	0	-0.301
<i>beta spectrin2</i> Reg 1	1,000	0.340	12	-0.014
<i>beta spectrin2</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
<i>Tampón TE*</i>	0	0.430	13	0.000

Agua	0	0.535	12	0.000
YFP**	1,000	0.480	9	-0.386

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

5 **YFP = Proteína fluorescente amarilla

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

Transformación mediada por *Agrobacterium*

Las células de maíz transgénico, tejidos y plantas de maíz transgénico que producen una o más moléculas de ARNdh insecticida (por ejemplo, al menos una molécula de ARNdh que incluye una molécula de ARNdh dirigida a un gen que comprende *rpII33* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3)) a través de la expresión de un gen quimérico integrado establemente en el genoma de la planta se producen mediante una transformación 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 invención estadounidense 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 partes de los cultivos de tejido transformado se presentan a larvas neonatas de gusano de la raíz del maíz para el bioensayo, esencialmente como se describe en el Ejemplo 1.

20 *Inicio del cultivo de Agrobacterium*. Madres de glicerol de células de la cepa de *Agrobacterium* DAT13192 (Publicación internacional del PCT núm. WO 2012/016222A2) que alojan un vector de transformación binario descrito precedentemente (Ejemplo 4) se siembran en placas de 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. Los cultivos se siembran luego sobre placas de YEP (gm/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 madre del medio de inoculación y acetosiringona se prepara en un volumen adecuado para la cantidad de constructos del experimento 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 and E. C. Yeung, (Eds), Springer Science and Business Media, LLC. páginas 327-341)) contiene: 2.2 gm/L de sales de MS;

1X de vitaminas de MS modificadas por ISU (Frame *et al.*, *ibid.*) 68.4 gm/L de sucrosa; 36 gm/L de glucosa; 115 mg/L de L-prolina; y 100 mg/L de mio-inositol; a pH 5.4). Se agrega acetosiringona al matraz que contiene el medio de inoculación hasta una concentración final de 200 µM de una solución madre 1 M en 100 % de sulfóxido de dimetilo y la solución se mezcla completamente.

- 5 Para cada constructo, se suspenden 1 o 2 bucles completos inoculantes de *Agrobacterium* de la placa de YEP en 15 mL de la solución madre de medio de inoculación/acetosiringona en un tubo centrífugo 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
10 coloca luego horizontalmente en un batidor de plataforma establecido a aproximadamente 75 rpm a temperatura ambiente y se bate 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 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
15 espigas. Las espigas se cosechan aproximadamente a los 10 a 12 días luego de la polinización. En el día experimental, las espigas descascaradas 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
20 de largo) se diseccionan asépticamente de cada espiga y se distribuyen aleatoriamente en tubos microcentrífugos que contienen 2.0 mL de una suspensión de células de *Agrobacterium* adecuadas en un medio líquido de inoculación con 200 µM de acetosiringona en el que se agregan 2 µL de tensoactivo 10 % BREAK-THRU® S233 (Evonik Industries; Essen, Alemania). Para un conjunto dado de experimentos, los embriones de las espigas agrupadas se utilizan para cada transformación.

25 *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 un medio de cocultivo, que contiene 4.33 gm/L de sales MS; 1X de vitaminas de MS modificadas por ISU; 30 gm/L de sucrosa; 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 mio-inositol; 100 mg/L de hidrolizado enzimático de caseína; 15 mg/L
30 AgNO₃; 200 µM de acetosiringona en DMSO; y 3 gm/L GELZAN™, a pH 5.8. La suspensión líquida de *Agrobacterium* se retira con una pipeta de transferencia estéril, 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 un incubador 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 gm/L de sales de MS; 1X de vitaminas de MS modificadas por ISU; 30 gm/L de sucrosa; 700 mg/L de L-prolina; 3.3 mg/L de Dicamba en KOH; 100 mg/L de mio-inositol; 100 mg/L de hidrolisato enzimático de caseína; 15 mg/L de AgNO_3 ; 0.5 gm/L de MES (monohidrato de ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico; 10 PhytoTechnologies Labr.; Lenexa, KS); 250 mg/L de carbenicilina; y 2.3 gm/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 un medio de selección I, que consiste en el medio de descanso (indicado precedentemente) con 100 nM de ácido de R- 15 Haloxifop (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 un medio de selección II, que consiste en un medio de descanso (indicado anteriormente) con 500 nM de ácido de R-Haloxifop (0.181 mg/L). Las placas se regresan a las cajas transparentes y se incuban a 27 °C con 20 luz continua a 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 un medio de prerregeneración. El medio de prerregeneración contiene 4.33 gm/L de sales de MS; 1X de vitaminas de MS modificadas por ISU; 45 gm/L de sucrosa; 350 mg/L de L-prolina; 100 mg/L de mio-inositol; 50 mg/L de 25 hidrolizado enzimático de caseína; 1.0 mg/L de AgNO_3 ; 0.25 gm/L de MES; 0.5 mg/L de ácido naftalenacético en NaOH; 2.5 mg/L de ácido abscísico en etanol; 1 mg/L de 6-bencilaminopurina; 250 mg/L de carbenicilina; 2.5 gm/L de Gelzan™; y 0.181 mg/L de ácido Haloxifop; a pH 5.8. Las placas 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 30 medio de 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 gm/L de sales de MS;

1X de vitaminas de MS modificadas por ISU; 60 gm/L de sucrosa; 100 mg/L de mio-inositol; 125 mg/L de carbenicilina; 3 gm/L de goma Gellan™; y 0.181 mg/L de ácido R-Haloxifop; a pH 5.8. Después los brotes pequeños con raíces primarias se aíslan y transfieren a un medio de elongación sin selección. El medio de elongación contiene 4.33 gm/L de sales MS; 1X de vitaminas de MS modificadas por ISU; 30 gm/L de sucrosa; y 3.5 gm/L de Gelrite™; a pH 5.8.

Los brotes de vegetales transformados seleccionados por su capacidad para crecer en un medio que contiene haloxifop se trasplantan desde Phytatrays™ a macetas pequeñas rellenas con un medio de crecimiento (ProMix BX; Premier Tech Horticulture), cubiertas con cúpulas o HUMI-DOMES (ARCO PLASTICS) y luego se aclimatan en una cámara de crecimiento 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 *AADI* de tolerancia a herbicidas integrado en el genoma del maíz. Además, se utilizan 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 su posterior 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; 16 horas de día; 27 °C día/ 24 °C noche).

Las plantas que se usarán para los bioensayos de insectos se trasplantan de las macetas pequeñas a Tinus™ 350-4 Roottrainers® (Spencer-Lemaire Industries, Acheson, Alberta, Canada;) (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 que se cultivaron en un 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 utilizan para validar la expresión del transgén. 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 horquilla) en ARN expresados se utilizan alternativamente para validar la presencia de transcritos de horquilla. Los niveles de expresión del ARN del transgén se miden con respecto a los niveles de ARN de un gen de maíz endógeno.

Los análisis del ADN por qPCR para detectar una parte de la región codificante de *AAD1* en ADN_g se utilizan para estimar la cantidad de copias de inserción de transgenes. Las muestras para estos análisis se recogen de plantas que se cultivaron en cámaras ambientales. Los resultados se comparan con los resultados de la qPCR de ADN de los ensayos diseñados para detectar una parte de un gen nativo de una única copia, y se adelantan eventos simples (que poseen una o dos copias de transgenes *rpII33*) para otros estudios en el invernadero.

Adicionalmente, los ensayos de qPCR diseñados para detectar una parte del gen de resistencia a la espectinomicina (*SpecR*; alojado en los plásmidos vectores binarios fuera del T-ADN) se utilizan para determinar si las plantas transgénicas contienen secuencias de estructura principal de plásmidos integradas extrañas. Nivel de expresión del transcrito de ARN: qPCR objetivo. Los eventos de células de callos o las plantas transgénicas se analizan mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de la secuencia objetivo para determinar el nivel de expresión relativa del transgén en comparación con el nivel del transcrito de un gen de maíz interno (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:54; núm. de acceso al GENBANK BT069734), que codifica una proteína tipo TIP41 (es decir, un homólogo de maíz con número de acceso al GENBANK AT4G34270; que posee un puntaje tBLASTX de 74 % de identidad). El ARN se aísla con el estuche de aislamiento de ARN total Norgen BioTek™ (Norgen, Thorold, ON). El ARN total se somete a un tratamiento de DNaseI en columna 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 hasta 50 ng/μL. El ADN_c de primera hebra se prepara con un estuche de síntesis de ADN_c de alta capacidad "High Capacity cDNA synthesis kit" (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)

(TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN, donde V es A, C, o G, y N es A, C, G, o T; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:55) en el tubo de 1 mL de mezcla madre de cebador aleatoria, para preparar una madre de trabajo de los cebadores aleatorios y oligo dT combinados.

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 los ensayos de genes objetivo, se realizan las reacciones con el conjunto 2 de cebadores directos de v1 de rpII33 (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:56) y el conjunto 2 de v1 de rpII33 inversos (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:57) y una sonda IDT Custom Oligo conjunto 2 de v1 de rpII33, etiquetadas con FAM y doble inactivación con inactivadores Zen e Iowa Black (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:105); o conjunto 2 de cebadores directos de v2 de rpII33 (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:111) y conjunto 2 de v2 de rpII33 inversos (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:112) y sonda IDT Custom Oligo conjunto 2 de v2 de rpII33SEC. CON NÚM. DE IDENT.:SEC. CON NÚM. DE IDENT.:SEC. CON NÚM. DE IDENT.:SEC. CON NÚM. DE IDENT.:SEC. CON NÚM. DE IDENT.:SEC. CON NÚM. DE IDENT.:, etiquetadas con FAM y de doble inactivación con inactivadores Zen y Iowa Black (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106). Para el ensayo de genes de referencia tipo TIP41, se utilizan cebadores TIPmxF (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:58) y TIPmxR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:59) y la sonda HXTIP (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:60) 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 la muestra. Las secuencias de cebadores y sondas se indican en la Tabla 6. Las recetas de los componentes de la reacción para la detección de 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 utilizadas para los análisis moleculares de los niveles de transcritos en maíz transgénico.

Objetivo	Oligonucleótido	Secuencia
<i>rpII33-2 v1</i>	RPII33-2 v1 FWD Set 2	GATCAAACCTCGACATGTAACAACCTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:56)
<i>rpII33-2 v1</i>	RPII33-2 v1 REV Set 2	GGATTCATCATCACGATGTTTGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:57)
<i>rpII33-2 v1</i>	RPII33-2 v1 PRB Set 2	/56-FAM/AGTGATCCA/ZEN/CGAGTCATACCAGCTACT /3IABkFQ/ (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:105)
<i>RpII33-2 v2</i>	RpII33-2 v2 FWD Set 2	AAAGAGCATGCCAAATGGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:110)
<i>RpII33-2 v2</i>	RpII33-2 v2 REV Set 2	GGCCATTCGTCTGGTTTAG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:111)
<i>RpII33-2 v2</i>	RpII33-2 v2 PRB Set 2	/56-FAM/TGTGGTGTT/ZEN/GCCTTTGAATATGATCCTGA /3IABkFQ/ (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106)
TIP41	TIPmxF	TGAGGGTAATGCCAACTGGTT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:58)
TIP41	TIPmxR	GCAATGTAACCGAGTGTCTCTCAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:59)
TIP41	HXTIP	TTTTTGGCTTAGAGTTGATGGTGTACTGATGA (SEC.

*Proteína tipo TIP41.

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

	<i>rpII33</i>	Gen tipo TIP
Componente	Concentración final	
Tampón Roche	1 X	1X
<i>rpII33</i> (F)	0.4 µM	0
<i>rpII33</i> (R)	0.4 µM	0
<i>rpII33</i> (FAM)	0.2 µM	0
HEXtipZM F	0	0.4 µM
HEXtipZM R	0	0.4 µM

HEXtipZMP (HEX)	0	0.2 μ M
ADNc (2.0 μ L)	NA	NA
Agua	hasta 10 μ L	hasta 10 μ L

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

Gen objetivo y detección 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

- 10
- 15 Los datos se analizan con el software LightCycler™ v1.5 mediante cuantificación relativa con el uso de un segundo algoritmo máximo derivado para calcular los valores 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, $2^{-(C_q \text{ OBJETIVO} - C_q \text{ REF})}$), que depende de la comparación de las diferencias de los valores Cq entre dos objetivos, con el valor de base de 2 seleccionado con la
- 20 suposición de que, para las reacciones de PCR optimizadas, el producto se duplica cada ciclo. Tamaño e integridad del transcrito: Ensayo Northern Blot. En algunos casos, la caracterización molecular adicional de las plantas transgénicas se obtiene mediante un análisis Northern Blot (blot de ARN) para determinar el tamaño molecular del ARNdh horquilla de *rpII33* en plantas transgénicas que expresan un ARNdh horquilla de *rpII33*.
- 25 Todos los materiales y el equipo se tratan con RNaseZAP (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 tejido 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 (TA) durante 10 min. Opcionalmente, las muestras se centrifugan durante 10 min a 4 °C a
- 30 11,000 rpm y se transfiere el sobrenadante a un tubo de 2 mL de safelock Eppendorf fresco. Luego de agregar 200 μ L de cloroformo al homogeneizado, el tubo se mezcla por inversión durante 2 a 5 min, se incuba a TA 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 TA 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 gránulo de ARN se lava dos veces con 1 mL de etanol al 70 %, con centrifugado a 7,500 x g durante 10 min a 4 °C a 25 °C entre los lavados. Se desecha el etanol y el gránulo 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 hasta 5 µg/10 µL. Se agrega luego 10 µL de glioxal (AMBION/INVITROGEN) a cada muestra. Se colocan cinco a 14 ng de mezcla marcadora 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 sobre hielo hasta que se cargan en un gel de agarosa al 1.25 % SeaKem gold (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 2X de SSC durante 5 min y se analiza por imágenes en una estación gel doc (BioRad, Hercules, CA), luego el ARN se transfiere pasivamente a una membrana de nylon (Millipore) durante la noche a TA, con SSC 10X como tampón de transferencia (20X de SSC 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 2X de SSC 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 consiste en de un producto amplificado por PCR que contiene la secuencia de interés (por ejemplo, la parte de la secuencia antisentido de SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:5-8, o 103-104, 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, se somete la membrana de transferencia a lavados con DIG, se envuelve, se expone a una película durante 1 a 30 minutos, luego se desenvuelve la película, todo mediante métodos recomendados por el proveedor del estuche 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 tejido Klecko™ (Garcia

Manufacturing, Visalia, CA) en un tampón de lisis Biosprint96 AP1 (provisto 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 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 utilizarán en los ensayos de sondas de hidrólisis para detectar el gen objetivo (por ejemplo *rpII33*), la secuencia enlazante y/o detectar una parte del gen *SpecR* (es decir, el gen de resistencia a la espectinomicina generado en los plásmidos vectores binarios; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:61; oligonucleótidos SPC1 en la Tabla 9) se diseñan con el software de diseño de sondas LightCycler® 2.0. Además, los oligonucleótidos que se utilizarán en los ensayos de sondas de hidrólisis para detectar un segmento del gen *AAD-I* de tolerancia al herbicida (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:62; oligonucleótidos GAAD1 en la Tabla 9) se diseñan con el software Primer Express (Applied Biosystems). La Tabla 9 muestra las secuencias de cebadores y sondas. Los ensayos se multiplexan con reactivos para un gen cromosómico de maíz endógeno (Invertasa (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:63; núm. de acceso al GENBANK: U16123; mencionado en la presente como IVR1), que sirve como una secuencia de referencia de interna para asegurarse de que el ADNg se halle presente en cada ensayo. Para la amplificación, se prepara una mezcla LightCycler® 480 PROBES MASTER (Roche Applied Science) a una concentración final 1x en una reacción multiplex 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 de dos pasos de acuerdo con lo reseñado en la Tabla 11. La activación de fluoróforos y la emisión para las sondas etiquetadas con FAM y HEX son como las que se describieron anteriormente; los conjugados de CY5 se estimulan lo máximo a 650 nm y fluorescen a un máximo de 670 nm.

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 descripta anteriormente (ut supra; pPCR de ARN).

Tabla 9. Secuencias de cebadores y sondas (con conjugado fluorescente) utilizado 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.:64)
	GAAD1-R	CAACATCCATCACCTTGACTGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:65)
5	GAAD1-P (FAM)	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:66)
	IVR1-F	TGGCGGACGACGACTTGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:67)
	IVR1-R	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:68)
10	IVR1-P (HEX)	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:69)
	SPC1A	CTTAGCTGGATAACGCCAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:70)
	SPC1S	GACCGTAAGGCTTGATGAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:71)
	TQSPEC (CY5*)	CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:72)
	Bucle- F	GGAACGAGCTGCTTGCGTAT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:73)
15	Bucle- R	CACGGTGCAGCTGATTGATG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:74)
	Bucle-P (FAM)	TCCCTTCCGTAGTCAGAG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:75)

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)	Madre	Conc. final
	2x Tampón	5.0	2x	1x
	Cebador delantero adecuado	0.4	10 μM	0.4
25	Cebador inverso adecuado	0.4	10 μM	0.4
	Sonda adecuada	0.4	5 μM	0.2
	Cebador inverso IVR1	0.4	10 μM	0.4
	Cebador inverso IVR1	0.4	10 μM	0.4
	Sonda IVR1	0.4	5 μM	0.2
30	H ₂ O	0.6	NA*	NA

ADNg	2.0	ND**	ND
Total	10.0		

*NA = No aplicable

5 **ND = No Determinado/a

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

10	Análisis de la cantidad de copias genómicas			
	Proceso	Temp.	Tiempo	núm. de ciclos
	Activación objetivo	95 °C	10 min	1
	Desnaturalización	95 °C	10 seg	40
	Extender y adquirir FAM, HEX, o CY5	60 °C	40 seg	
15	Enfriar	40 °C	10 seg	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. Ver, por ejemplo, Baum *et al.* (2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-1326. Puede demostrarse la eficacia, por ejemplo, al alimentar a los insectos objetivo con diversos tejidos vegetales o trozos de tejido derivados 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 conducidos en forma 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 eclosionaron de huevos lavados y se los coloca en

cada pocillo de la bandeja de bioensayo. Los pocillos se cubren luego con una cubierta de pestaña Pull-N-Peel™ [*Tire y despegue*] (BIO-CV-16, BIO-SERV) y se colocan en un incubador a 28 °C con un ciclo de 18 h/6 h de luz/oscuridad. A los nueve días de la infestación inicial, se estima 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 (del control negativo). 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 de Petri con una fracción de la suspensión de huevos para monitorear las tasas de eclosión.

El suelo alrededor de las plantas de maíz que se cultivan 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 clasificación, 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 otro daño 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 T₀ transgénicas de *Zea* de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 6. Se obtienen otras 10-20 líneas independientes T₁ de *Zea mays* que expresan el ARNdh horquilla para un constructo de iARN para la estimulación del gusano de la raíz del maíz. El ARNdh horquilla comprende una parte de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3 (por ejemplo, el ARNdh horquilla transcrito de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103 y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104). Los ARNdh horquilla adicionales se derivan, por ejemplo, de secuencias de plagas de coleópteros como, por ejemplo, Caf1-180 (Publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2012/0174258), VapaseC (Publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2012/0174259), Rho1 (Publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2012/0174260), VapaseH (Publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2012/0198586), PPI-87B (Publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2013/0091600), RPA70 (Publicación de solicitud de patente de invención estadounidense nro. 2013/0091601), RPS6 (Publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 2013/0097730), ROP (Publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 14/577811), ARNP11 (Publicación de solicitud de patente de invención estadounidense núm. 14/577854), *Dre4* (Solicitud de patente de invención estadounidense núm. 14/705,807), *ncm* (Solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/095487), *COPI alpha* (Solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/063,199), *COPI beta* (Solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/063,203), *COPI gamma* (Solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/063,192), o *COPI delta* (Solicitud de patente de invención estadounidense núm. 62/063,216). Se confirman a través de RT-PCR u otros métodos de análisis molecular.

Las preparaciones de ARN total de líneas independientes T₁ seleccionadas se utilizan para RT-PCR con cebadores diseñados para unirse en el enlazante del casete de expresión de horquilla en cada uno de los constructos de iARN. Además, los cebadores específicos para cada gen objetivo en un constructo de iARN se utilizan opcionalmente para amplificar y confirmar la producción del ARNm preprocesado requerido para la producción de ARNi *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión del ARN horquilla en cada planta transgénica de *Zea mays*. El procesamiento de la horquilla de ARNdh de los genes objetivo en ARNi se confirma posteriormente en forma opcional en líneasmembrana de ARN.

Más aún, las moléculas de ARNi que poseen secuencias con faltas de coincidencias con más de un 80 % de identidad de secuencias respecto de los genes objetivo afectan a los gusanos de la raíz del maíz de manera similar a la observada con las moléculas de ARNi que poseen una identidad de secuencia

del 100 % respecto de los genes objetivo. El apareamiento de la secuencia no coincidente con secuencias nativas para formar un ARNd_h horquilla en el mismo constructo de iARN proporciona ARNi_p procesados por la plantacápsulas de afectar el crecimiento, desarrollo y la viabilidad de alimentación de las plagas de coleópteros.

- 5 La administración *in planta* de ARNd_h, ARNi_p, o miARN correspondiente a genes objetivo y a la captación subsiguiente 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 de genes 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
- 10 WCR, NCR, SCR, MCR, *D. balteata* LeConte, *D. u. tenella*, *D. speciosa* Germar, y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim, conduce a la imposibilidad de infestar, alimentarse, desarrollarse exitosamente y/o a la muerte de la plaga de coleópteros. La elección de genes objetivo y la aplicación exitosa de la iARN se utilizan entonces para controlar plagas de coleópteros.

Comparación fenotípica de las líneas de iARN transgénicas y *Zea mays* no transformadas. Los genes

15 objetivo de plagas de coleópteros o las secuencias seleccionadas para crear ARNd_h horquillas no poseen similitud con ninguna secuencia conocida de genes de vegetales. 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

20 las plantas no transformadas así como también aquellas líneas transgénicas transformadas con un vector "vacío" que no posee ningún gen que exprese una horquilla. Se comparan 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

25 transgénicas y aquellas sin la expresión de moléculas de ARNi_p objetivo cuando se cultivan *in vitro* y en el suelo en el invernadero.

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

Una planta transgénica de *Zea mays* que comprende una secuencia codificante heteróloga en su

30 genoma que se transcribe en una molécula de ARNi_p dirigida a un organismo que no pertenece a una plaga de coleópteros, se transforma secundariamente mediante metodologías de *Agrobacterium* o WHISKERS™ (ver 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 y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3). Los vectores plásmidos de transformación de plantas preparadas 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 heteróloga codificante en su genoma que se transcribe en una molécula de ARNi que tiene como objetivo un organismo que no pertenece a una plaga de coleópteros.

Ejemplo 11: *Zea mays* transgénico que comprende un constructo de ARNi 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 en una molécula de ARNi que tiene como objetivo 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 o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3) se transforma secundariamente por medio de metodologías que utilizan *Agrobacterium* o WHISKERS™ (ver, Petolino y Arnold (2009) Methods Mol. Biol. 526:59-67) para producir una o más moléculas de proteínas insecticidas, por ejemplo, proteínas insecticidas Cry3, Cry6, Cry34 y Cry35. Los vectores plásmidos de transformación de plantas preparadas esencialmente del modo 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 en una molécula de ARNi dirigida a un organismo de una plaga de coleópteros. Se obtienen plantas doblemente transformados que producen moléculas de ARNi y proteínas insecticidas para el control de plagas de coleópteros.

EJEMPLO 12: Cribaje de genes objetivo candidatos en chinches marrones neotropicales (*Euschistus heros*)

Colonia de chinches marrones neotropicales (BSB; *Euschistus heros*). Se criaron BSB en un incubador 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 ventilación. Cada recipiente de cría proporcionó aproximadamente 300-400 BSB adultos. En todas las etapas, los insectos se alimentaron con frijoles verdes frescos tres veces por semana y se reemplazó una vez por semana una

bolsita de mezcla de semillas que contenía semillas de girasol, granos de soja y cacahuets (relación ponderal 3:1:1). Se proveyó agua en matraces con tapones de algodón como mechas. Luego de las dos semanas iniciales, los insectos se transfirieron a un nuevo recipiente una vez por semana.

Dieta artificial del BSB. Se preparó una dieta artificial para el BSB de la siguiente manera. Se procesaron frijoles verdes liofilizados hasta obtener un polvo fino en una procesadora MAGIC BULLET® mientras se procesaban cacahuets crudos (orgánicos) en una procesadora separada MAGIC BULLET®. Los ingredientes procesados secos se combinaron (porcentajes en peso: frijoles verdes, 35 %; cacahuets, 35 %; sucrosa, 5 %; complejo vitamínico (por ejemplo, mezcla vitamínica Vanderzant para insectos, SIGMA-ALDRICH, Catálogo núm. V1007), 0.9 %); en una procesadora grande MAGIC BULLET®, que se tapó y se 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 mezclaron manualmente hasta que la solución se combinó completamente. La dieta se conformó en tamaños deseados, se envolvió de forma suave 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 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 con un sistema illumina® HiSeq™ (San Diego, CA) proporcionó secuencias de genes objetivo candidatos para usar en la tecnología de control de insectos con 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 software ensamblador TRINITY™ (Grabherr *et al.* (2011) Nature Biotech. 29:644-652). Los transcritos ensamblados se combinaron para generar un transcriptoma agrupado. Este transcriptoma agrupado de BSB contenía 378,457 secuencias.

Identificación del ortólogo de *rpII33* de BSB Se realizó una búsqueda tBLASTn del transcriptoma agrupado de BSB con el uso como consulta del *rpII-33 de Drosophila* (secuencia de proteínas, núm. de acceso al GENBANK ABI30983). Se identificaron *rpII33-1* de BSB (SEC. CON NÚM. DE

IDENT.:76) y *rpII33-2* de BSB (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78) como genes objetivo candidatos de *Euschistus heros*, cuyos productos poseen las secuencias peptídicas predichas, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77 y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79 respectivamente.

Preparación de plantillas y síntesis del ARNd_h

- 5 Se preparó ADN_c a partir del ARN total de BSB extraído de un único insecto adulto joven (aproximadamente 90 mg) con el uso de un reactivo TRIzol[®] (LIFE TECHNOLOGIES). El insecto se homogeneizó a temperatura ambiente en un tubo microcentrífugo de 1.5 mL con 200 µL TRIzol[®] con una mano de mortero para gránulos (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
- 10 agregaron otros 800 µL 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 el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. De acuerdo con el protocolo de extracción de TRIzol[®] recomendado por el fabricante, el gránulo 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
- 15 por GFX PCR (Illustra[™]; GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES) con un tampón de elución Tipo 4 (es decir, 10 mM de Tris-HCl; pH 8.0). La concentración de ARN se determinó con 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

20 "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 mostrados en la Tabla 12 se usaron para amplificar BSB_*rpII33-1*, BSB_*rpII33-2*, BSB_*rpII33-3*. La plantilla de ADN se amplificó mediante "PCR touchdown" (temperatura de

25 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 255 pb de BSB_*rpII33-1* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:80), un segmento de 111 pb de BSB_*rpII33-1* v1 (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81), y un segmento de 398 pb de BSB_*rpII33-2* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:82) se generaron durante 35 ciclos de PCR. El procedimiento mencionado

30 precedentemente también se usó para amplificar la plantilla de YFPv2 de control negativo de 301 pb (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:89), con el uso de los cebadores YFPv2-F (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:90) y YFPv2-R (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:91). Los cebadores BSB_*rpII33-1*, BSB_*rpII33-2*

rpII33-1 v1, BSB_ *rpII33-2*, y YFPv2 contenían una secuencia promotora de fagos T7 (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9) en sus extremos 5' y, de este modo, permitían el uso de fragmentos de ADN de YFPv2 y BSB_ *rpII33* para la transcripción del ARNdh.

Tabla 12. Cebadores y pares de cebadores utilizados para amplificar porciones de regiones codificantes de genes objetivo *rpII33* ilustrativos y un gen de control negativo de *YFP*.

	Id. del gen	Id. del cebador	Secuencia
10	Par 20	<i>rpII33-1</i>	BSB_ <i>rpII33-1</i> _For TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTG AATCAGATGATATTTTGATTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83)
			BSB_ <i>rpII33-1</i> _Rev TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTA GGTTTGGCTTCCCAATTAAATG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:84)
15	Par 21	<i>rpII33-1 v1</i>	BSB_ <i>rpII33-1 v1</i> _For TTAATACGACTCACTATAGGGAGATTGTT TTGAGTATGACCCTGACAAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85)
			BSB_ <i>rpII33-1 v1</i> _Rev TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAG CTTCATACTGATCCTCATCTAATTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:86)
20	Par 22	<i>rpII33-2</i>	BSB_ <i>rpII33-2</i> _For TTAATACGACTCACTATAGGGAGACGTC GAAATCATCAAAAACAACACG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87)
			BSB_ <i>rpII33-2</i> _Rev TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGT CCAGTAGTTTGTGGACCTAG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:88)
25	Par 23	YFP	YFPv2-F <i>TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCATCTG GAGCACTTCTCTTTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:90)</i>
			YFPv2-R <i>TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCATCTC CTTCAAAGGTGATTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:91)</i>

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. Ver la FIG. 1. El ARNdh se cuantificó en un espectrofotómetro NANODROP™, y se diluyó hasta 500 ng/ μ L en un tampón de 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 frijoles verdes 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 pesaba de 1 a 1.5 mg) se manipularon delicadamente con un pequeño cepillo 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 500 ng/ μ L de solución de ARNdh (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 un inyector NANOJECT™ II (DRUMMOND SCIENTIFIC, Broomhall, PA), equipado con una aguja de inyección que se extrajo desde 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 ligero 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 un gránulo 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 microcentrífugo 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 realizaron conteos de la viabilidad y los pesos el día 7 luego de las inyecciones.

rpII33 de BSB es un objetivo de ARNdh letal

De acuerdo con el resumen de la Tabla 13 y Tabla 14, 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 BSB_*rpII33-1*, BSB_*rpII33-2*, y BSB_*rpII33-1* v1 (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 estos ARNdh fue significativamente diferente de aquella observada con la misma cantidad de ARNdh de *YFP* v2 inyectado (control negativo), con $p < 0.05$ (prueba t de Student).

Tabla 13. Resultados de la inyección de ARNdh de BSB_*rpII33* en el hemocoel de ninfas de chinches marrones neotropicales de segundo instar a los siete días luego de la inyección.

Tratamiento*	Ensayos núm.	Media del % de mortalidad $\pm$ SEM**	prueba <i>t</i> valor p
<i>rpII33-1</i>	3	66.7 $\pm$ 8.82	5.78E-03***
<i>rpII33-2</i>	3	6.67 $\pm$ 6.67	7.25E-01
No inyectado	3	0.00 $\pm$ 0.00	1.58E-01
<i>YFP</i> v2 ARNdh	3	10.0 $\pm$ 5.77	

*Diez insectos inyectados por ensayo para cada ARNdh.

**Error estándar de la media.

***Significativamente diferente del control de ARNdh de *YFP* v2 con el uso de una prueba *t* de Student. ($p < 0.05$).

Tabla 14. Resultados de la inyección de ARNdh de BSB_ *rpII33-1* v1 en el hemocoel de ninfas de chinches marrones neotropicales de segundo instar a los siete días luego de la inyección.

Tratamiento *	N ensayos	% de mortalidad $\pm$ SEM**	prueba <i>t</i> valor p
BSB_ <i>rpII33-1</i> v1	3	51 $\pm$ 24.7	1.98E-01
no inyectado	3	3 $\pm$ 3.3	5.61E-01
<i>YFP</i> v2 ARNdh	3	10 $\pm$ 10	

*Diez insectos inyectados por ensayo para cada ARNdh.

**Error estándar de la media.

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

Se generan de diez a 20 plantas transgénicas T₀ de *Zea mays* que alojan vectores de expresión para ácidos nucleicos que comprenden cualquier parte de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78 (por ejemplo, SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82) de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 4. Se obtienen otras 10-20 líneas independientes T₁ de *Zea mays* que expresan el ARNdh horquilla para un constructo de iARN para la estimulación de BSB. Se hacen derivar ARNdh horquilla que poseen una parte de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78, o sus segmentos (por ejemplo, SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82). Se confirman

mediante RT-PCR u otros métodos de análisis molecular. Las preparaciones de ARN total a partir de líneas independientes seleccionadas T₁ 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 ARNi. Además, se utilizan opcionalmente cebadores específicos para cada gen objetivo en un constructo de iARN para amplificar y conformar 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 horquilla en cada planta transgénica de *Zea mays*. El procesamiento del ARNdh horquilla de los genes objetivo en ARNip se confirma luego opcionalmente en líneas transgénicas independientes con el uso de hibridaciones por membrana de transferencia de ARN.

Más aún, las moléculas de ARNi que poseen secuencias con faltas de coincidencias con más de 80 % de identidad de secuencia respecto de los genes objetivo afecta a los hemípteros de manera similar a la observada con moléculas de ARNi que poseen 100 % de identidad de secuencia respecto de los genes objetivo. El apareamiento de la secuencia con falta de coincidencias con secuencias nativas para formar un ARNdh horquilla en el mismo constructo de iARN, proporciona ARNip procesados por la planta capaces de afectar el crecimiento, desarrollo y la viabilidad de la alimentación de las plagas de hemípteros.

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 de genes mediado por ARN. Cuando la función de un gen objetivo es importante en una o más etapas de desarrollo, el crecimiento, desarrollo y/o la supervivencia de la plaga de hemípteros es afectada 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 meditabunda*, *Thyanta perditor*, *Horcias nobilellus*, *Taedia stigmosa*, *Dysdercus peruvianus*, *Neomegalotomus parvus*, *Leptoglossus zonatus*, *Niesthrea sidae*, *Lygus hesperus*, y *L. lineolaris*, lleva 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 utilizan luego para controlar las plagas de hemípteros.

Comparación fenotípica de líneas transgénicas de ARNi y *Zea mays* no transformado. Los genes o las secuencias de plagas de hemípteros objetivo que se seleccionan para crear ARNdh horquilla no poseen ninguna similitud con ninguna secuencia de genes de 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 posean algún efecto perjudicial sobre plantas transgénicas. Sin embargo, las características del desarrollo y morfológicas de las líneas transgénicas se comparan con plantas no transformadas así como también con aquellas líneas transgénicas transformadas con un vector "vacío" que no posee ningún gen que exprese una horquilla. Se comparan las características de las raíces, brotes, follaje y reproducción de la planta. Se registran las características de los brotes de la planta como, por ejemplo, la altura, cantidad y tamaño de las hojas, momento de la floración, tamaño floral y apariencia. En general, no existen diferencias 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 diez a 20 plantas transgénicas T₀ de *Glycine max* que alojan vectores de expresión para ácidos nucleicos que comprenden una parte de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78, o sus segmentos (por ejemplo, SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82) 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 una caja negra a 24 °C.

Preparación de semillas de soja divididas. Las semillas de soja divididas que comprenden una parte 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 hilio de la semilla para separar y retirar el recubrimiento de la semilla y partir la semilla en dos secciones cotiledóneas. Debe prestarse especial atención para retirar parcialmente el eje embrionario, donde permanece aproximadamente 1/2–1/3 del embrión fijado al extremo nodal del cotiledón.

Inoculación. Las semillas divididas de soja que comprenden una parte 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 la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78, y/o sus segmentos (por ejemplo, SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82). La solución de *A. tumefaciens* se diluye hasta una

concentración final de $\lambda=0.6$ 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, 2^a 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 un medio líquido de inducción de brotes (SI) que consiste en sales de B5, vitaminas B5, 28 mg/L de hierro, 38 mg/L de Na₂EDTA, 30 g/L de sucrosa, 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 un 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 sucrosa, 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 el medio de inducción de brotes 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 (EB). El medio de EB consiste en sales de MS, 28 mg/L de hierro, 38 mg/L de Na₂EDTA, 30 g/L de sucrosa 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 un medio de EB fresco cada 2 semanas. Los cultivos se dejan crecer en una cámara de crecimiento Conviron™ a 24 °C con un fotoperíodo de 18 h a una intensidad lumínica de 80-90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{seg}$.

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 de cotiledón, y al sumergir el 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 sucrosa y 0.59 g/L de MES, 50 mg/L de asparagina, 100 mg/L de L-ácido piroglutámico, 7 g/L de agar Noble, pH 5.6) en bandejas Phyta.

Cultivo. Luego del cultivo en una cámara de crecimiento 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
5 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 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 transferirse al
10 invernadero para otra aclimatación y el establecimiento de plantas de soja transgénicas robustas.

Se obtienen otras 10-20 líneas independientes T_1 de *Glycine max* que expresan el ARNdh de horquilla para un constructo de iARN para la estimulación del BSB. Puede hacerse derivar un ARNdh de horquilla que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 y/o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78, o sus segmentos (por ejemplo, SEC. CON NÚMS. DE IDENT.:80-82). Se confirman a través de una
15 RT-PCR u otros métodos de análisis molecular conocidos en la técnica. Las preparaciones de ARN total de líneas independientes seleccionadas T_1 se utilizan 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 utilizan opcionalmente cebadores específicos para cada gen objetivo en un constructo de iARN para amplificar y confirmar la producción del ARNm
20 preprocesado requerido para la producción de ARNip *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión del ARN horquilla en cada planta transgénica de *Glycine max*. El procesamiento de la horquilla de ARNdh de los genes objetivo en el ARNip se confirma luego opcionalmente en líneas transgénicas independientes con el uso de hibridaciones por membrana de transferencia de ARN.

25 Las moléculas de ARNi que poseen secuencias con falta de coincidencias con más de 80 % de identidad de secuencia respecto de genes objetivo afectan a los BSB de manera similar que la observada con las moléculas de ARNi que poseen 100 % de identidad de secuencia respecto de los genes objetivo. El apareamiento de la secuencia con falta de coincidencias con secuencias nativas para formar un ARNdh de horquilla en el mismo constructo de iARN provee ARNip procesado por la
30 planta capaz de afectar el crecimiento, desarrollo y la viabilidad de alimentación de las plagas de hemípteros.

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 de genes mediado por ARN. Cuando la función de un gen objetivo es importante en una o más etapas de desarrollo, el crecimiento, desarrollo, y la viabilidad de alimentación de la plaga de hemípteros se ven afectados y, en el caso de al menos uno de *Euschistus heros*, *Piezodorus guildinii*, *Halyomorpha halys*, *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 como también conduce a la muerte de la plaga de hemípteros. La elección de genes objetivo y la aplicación exitosa del ARNi se utiliza luego 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 poseen ninguna 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 posean un efecto perjudicial en vegetales transgénicos. Sin embargo, las características de desarrollo y morfológicas de las líneas transgénicas se comparan con plantas no transformadas, así como también con aquellas líneas transgénicas transformadas con un vector "vacío" que no posee ningún gen que exprese la horquilla. Se comparan las características de las raíces, brotes, follaje y reproducción de las plantas. Las características de los brotes de las plantas como, por ejemplo, la altura, la cantidad y los tamaños de las hojas, el momento de la floración, el tamaño floral y la apariencia se registran. En general, no existe ninguna diferencia morfológica observable 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 15: Bioensayos de *E. heros* en una dieta artificial

En los ensayos de alimentación de ARNdh sobre una dieta artificial, se colocan bandejas de 32 pocillos con un gránulo de ~18 mg de dieta artificial y agua, como para experimentos de inyección (ver el Ejemplo 12). Se agrega ARNdh a una concentración de 200 ng/μL a la muestra de gránulo alimenticio y agua; 100 μL a cada uno de dos pocillos. Se introducen cinco ninfas de segundo instar de *E. heros* en cada pocillo. Las muestras de agua y ARNdh dirigidas a un transcrito de *YFP* se utilizan 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 significativa y/o la inhibición del crecimiento significativo en los pocillos provistos de ARNdh de *rpII33*, 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 la horquilla que comprende segmentos de *rpII33* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78) con el uso de métodos moleculares estándar similares a los del Ejemplo 4. La transformación de *Arabidopsis* se realiza con un procedimiento estándar basado en *Agrobacterium*. Se seleccionan semillas T₁ con un marcador de selección de
- 10 tolerancia al glufosinato. Se generan plantas transgénicas T₁ de *Arabidopsis* y se generan plantas transgénicas homocigotas de copia simple T₂ para los estudios de insectos. Se realizan bioensayos en las plantas en crecimiento de *Arabidopsis* 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 la horquilla que comprende un segmento de *rpII33* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76 o SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78) 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 transcriptos primarios de ARN se facilita mediante la disposición (dentro de una
- 20 única unidad de transcripción) de dos copias de un segmento de gen objetivo en orientaciones opuestas, donde los dos segmentos se separan mediante una secuencia enlazante (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107). De este modo, el transcrito de ARNm primario contiene las dos secuencias de genes *rpII33* 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 *Arabidopsis*
- 25 *thaliana* (Callis *et al.* (1990) J. Biological Chem. 265:12486-12493)) se utiliza para conducir la producción del transcrito de ARNm de horquilla primario y se utiliza 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 invención estadounidense 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 utilizan en reacciones de recombinación estándar GATEWAY[®] con un vector de destino binario típico para producir vectores de

transformación de la 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 invención estadounidense núm. 2011/0107455), bajo la regulación de un promotor v2 del virus mosaico de la nervadura de la yuca (CsVMV v2, Patente de invención estadounidense 7,601,885; Verdaguer *et al.* (1996) Plant Mol. Biol. 31:1129-39). Se utiliza 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 precedentemente) y un fragmento que comprende una región no traducida 3' del marco abierto de lectura 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 utiliza un estuche Qiagen Plasmid Max (Qiagen, Cat# 12162) para extraer plásmidos de cultivos de *Agrobacterium* de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante.

Transformación de *Arabidopsis* y selección de T₁. Doce a quince plantas de *Arabidopsis* (c.v. Columbia) se cultivan 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 madre de glicerol de *Agrobacterium* recombinante en 100 mL de caldo de 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 sucrosa + 0.04 % de Silwet-L77 (semillas Lehle Cat. núm. VIS-02) +10 $\mu\text{g}/\text{L}$ de solución de benzamino purina (BA) a una DO₆₀₀ 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 crecimiento normal con riego regular y fertilizando hasta la generación de semillas.

Ejemplo 17: Crecimiento y bioensayos de *Arabidopsis* transgénica

- 5 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 un 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 plantación. 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 un Roche LightCycler480[™]. Los cebadores de la PCR y las sondas de hidrólisis se diseñan contra un marcador de selección DSM2v2 mediante el software de diseño de sondas LightCycler[™] 2.0 (Roche). Las plantas se mantienen a 24 °C, con un fotoperíodo de 16:8 hora 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 intermedias (2-3 inserciones), y cuatro de número de copias alto (≥ 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 segundo instar de *E. heros* 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 nylon para aislar los insectos. Las plantas se mantienen bajo condiciones normales de temperatura, luz y riego en una conviron. En 14 días, los insectos se recogen y se pesan. Se calcula el porcentaje de la mortalidad así como también la inhibición del crecimiento (1 – peso con tratamiento / peso control). Se utilizan plantas que expresan la YFP como controles. Se observa la mortalidad y/o la inhibición del crecimiento significativas en las ninfas que se alimentan de plantas transgénicas que contienen el ARNdh de *BSB_rpII33* en comparación con aquellas de ninfas en las plantas de control.
- 30 Generación T₂ de semillas de *Arabidopsis* y bioensayos de T₂. Se producen semillas T₂ a partir de eventos d 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 precedentemente. 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 transgén de ARNdh de *rpII33* a los efectos de proporcionar el control de los 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 invención estadounidense 7,838,733, o Ejemplo 12 de la publicación de patente de invención internacional del PCT núm. WO 2007/053482.

Ejemplo 19: ARNdh de *rpII33* en el manejo de insectos

10 Se combinan transgenes de ARNdh de *RpII33* con otras moléculas de ARNdh en plantas transgénicas para proporcionar efectos de la iARN sinérgicos y de direccionamiento de la iARN redundantes. Las plantas transgénicas que incluyen, por ejemplo, en forma no limitante, maíz, soja, y algodón que expresan el ARNdh que tiene como objetivo al *rpII33* son útiles para evitar el daño producido por la alimentación de insectos coleópteros y hemípteros. Los transgenes de ARNdh de *RpII33* se combinan
15 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 de genes de manejo de la resistencia de insectos. Cuando se combinan con otras moléculas de ARNdh que tienen como objetivo plagas de insectos y/o con proteínas insecticidas en plantas transgénicas, se observa un efecto sinérgico insecticida que también reduce el desarrollo de poblaciones de insectos resistentes.