

MOLÉCULAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE SPT5 PARA CONTROLAR PLAGAS DE INSECTOS

REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. con núm. de serie 62/168,613, presentada el 29 de mayo de 2015, para “**SPT5 NUCLEIC ACID MOLECULES TO CONTROL INSECT PESTS.**”

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 La presente invención se relaciona en general con el control genético del daño en las plantas causado por las plagas de insectos (por ejemplo, plagas de coleópteros y plagas de hemípteros). En modalidades particulares, la presente invención se relaciona con la identificación de polinucleótidos codificantes y no codificantes objetivo, y el uso de tecnologías de ADN recombinante para la represión o inhibición postranscripcional de la expresión de los
- 15 polinucleótidos codificantes y no codificantes objetivo en las células de una plaga de insectos para proporcionar un efecto protector para las plantas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- El gusano de la raíz del maíz occidental (WCR), *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, es una de
- 20 las especies de gusano de la raíz del maíz más devastadoras en Norteamérica y es una preocupación particular en las áreas donde se cultiva el maíz de la región central de los Estados Unidos. El gusano de la raíz del maíz del norte (NCR), *Diabrotica barberi* Smith y Lawrence, es una especie estrechamente relacionada que cohabita en gran parte en el mismo rango que el WCR. Existen varias otras subespecies relacionadas de *Diabrotica* que son plagas significativas
- 25 en América: el gusano de la raíz del maíz mexicano (MCR), *D. virgifera zea* Krysan y Smith; el gusano del maíz del sur (SCR), *D. undecimpunctata howardi* Barber; *D. balteata* LeConte;

D. undecimpunctata tenella; *D. speciosa* Germar; y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos calcula que los gusanos de la raíz del maíz causan \$1 mil millones en ingresos perdidos cada año, que incluyen \$800 millones en pérdidas en el rendimiento y \$200 millones en costos de tratamiento.

- 5 Los huevos de WCR y NCR se depositan en el suelo durante el verano. Los insectos permanecen en la etapa de huevo durante todo el invierno. Los huevos son oblongos, blancos, y de menos de 0.004 pulgadas de longitud. Las larvas eclosionan a finales de mayo o principios de junio, con variación del momento preciso de la eclosión de los huevos de año en año debido a las diferencias de temperatura y ubicación. Las larvas recién eclosionadas son gusanos
- 10 blancos de menos de 0.125 pulgadas de longitud. Una vez eclosionadas, las larvas comienzan a alimentarse de las raíces del maíz. Los gusanos de la raíz del maíz pasan por tres estadios larvarios. Después de alimentarse durante varias semanas, las larvas mudan a la etapa de pupa. Empupan en el suelo, y después emergen del suelo como adultos en julio y agosto. Los gusanos de la raíz adultos son de aproximadamente 0.25 pulgadas de longitud.
- 15 Las larvas del gusano de la raíz del maíz completan su desarrollo en el maíz así como en varias otras especies de gramíneas. Las larvas criadas en la cola de zorro amarilla emergen después y tienen un tamaño de la cápsula de cabeza más pequeño como adultos que las larvas criadas en el maíz. Ellsbury *et al.* (2005) Environ. Entomol. 34:627-34. Los WCR adultos se alimentan de los estigmas, el polen y los granos del maíz en las puntas de las espigas expuestas. Si los
- 20 WCR adultos emergen antes de que los tejidos reproductivos del maíz estén presentes, ellos pueden alimentarse del tejido foliar, para de este modo enlentecer el crecimiento de la planta y ocasionalmente causar la muerte de la planta huésped. Sin embargo, los adultos rápidamente cambiarán a los estigmas y el polen preferidos cuando estén disponibles. Los NCR adultos también se alimentan de los tejidos reproductivos de la planta del maíz, pero por el contrario
- 25 raras veces se alimentan de las hojas del maíz.

La mayor parte del daño causado por el gusano de la raíz en el maíz se debe a la alimentación de las larvas. Los gusanos de la raíz recién eclosionados inicialmente se alimentan de los pelos finos de la raíz del maíz y horadan los ápices radicales. Conforme las larvas se hacen más grandes, estas se alimentan y horadan las raíces primarias. Cuando los gusanos de la raíz del maíz son abundantes, la alimentación de las larvas a menudo resulta en la poda de las raíces hasta llegar a la base del tallo del maíz. La lesión severa a las raíces interfiere con la capacidad de las raíces para transportar el agua y los nutrientes en la planta, reduce el crecimiento de la planta, y resulta en la reducción de la producción de granos, a menudo reduciendo de este modo drásticamente la producción global. La lesión severa a las raíces a menudo también resulta en el encorvamiento de las plantas de maíz, lo cual hace más difícil la cosecha y además disminuye la producción. Además, la alimentación por parte de los adultos en los tejidos reproductivos del maíz puede resultar en la poda de los estigmas en la punta de la espiga. Si este “recorte de los estigmas” es suficientemente severo durante la dispersión del polen, la polinización puede verse interrumpida.

El control de los gusanos de la raíz del maíz puede intentarse por medio de la rotación del cultivo, insecticidas químicos, bioplaguicidas (por ejemplo, la bacteria grampositiva formadora de esporas, *Bacillus thuringiensis*), plantas transgénicas que expresan toxinas *Bt* o una combinación de estos. La rotación del cultivo tiene la desventaja de imponer restricciones no deseadas en el uso de las áreas agrícolas. Además, la oviposición de algunas especies de gusanos de la raíz puede producirse en campos de frijol de soja, lo que mitiga de este modo la efectividad de la rotación del cultivo practicada con el maíz y el frijol de soja.

Los insecticidas químicos constituyen la estrategia de mayor peso para lograr el control del gusano de la raíz del maíz. El uso de insecticidas químicos, sin embargo, es una estrategia de control imperfecta del gusano de la raíz del maíz; más de \$1 mil millones pueden perderse en los Estados Unidos cada año debido al gusano de la raíz del maíz cuando los costos de los insecticidas químicos se agregan a los costos del daño causado por el gusano de la raíz que

puede producirse a pesar del uso de los insecticidas. En conjunto las elevadas poblaciones de larvas, las lluvias torrenciales, así como la aplicación inapropiada del(de los) insecticida(s) pueden resultar en el control inadecuado del gusano de la raíz del maíz. Además, el uso continuo de insecticidas puede seleccionar cepas de gusano de la raíz resistentes a los insecticidas, así como también causar problemas ambientales significativos debido a la toxicidad para las especies no objetivo.

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

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

Las chinches y otros insectos hemípteros (heterópteros) constituyen otro complejo de plagas agrícolas importantes. Alrededor del mundo, se conocen más de 50 especies de chinches estrechamente relacionadas que causan daños a los cultivos. McPherson & McPherson (2000)

Stink bugs of economic importance in America north of Mexico, CRC Press. Los insectos hemípteros están presentes en una gran cantidad de cultivos importantes que incluyen maíz, soja, frutas, vegetales y cereales.

Las chinches pasan por múltiples etapas de ninfa antes de alcanzar la etapa adulta. Estos insectos se desarrollan de huevos a adultos en aproximadamente 30-40 días. Tanto las ninfas como los adultos se alimentan de la savia de tejidos blandos en los que también inyectan enzimas digestivas que causan la digestión y necrosis extraoral del tejido. Después, el material vegetal digerido y los nutrientes se ingieren. 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 el rendimiento y la germinación se reducen considerablemente. En climas cálidos se producen múltiples generaciones lo que resulta en una presión significativa de insectos. El manejo actual de las chinches depende del tratamiento con insecticidas sobre la base de campos individuales. Por lo tanto, se necesitan con urgencia estrategias de manejo alternativas para minimizar las constantes pérdidas de los cultivos.

La interferencia por ARN (iARN) es un proceso que utiliza rutas celulares endógenas, por medio de las cuales una molécula de ARN interferente (ARNi) (por ejemplo, una molécula de ARN de doble hebra (ARNdh)) que es específica para la totalidad, o cualquier porción de tamaño adecuado, de un gen objetivo resulta en la degradación del ARNm codificado de este modo. En años recientes, la iARN se ha usado para realizar la “supresión” génica en varias especies y sistemas experimentales; por ejemplo, *Caenorhabditis elegans*, plantas, embriones de insectos, y células en cultivo de tejidos. Ver, por ejemplo, Fire *et al.* (1998) Nature 391:806-11; Martinez *et al.* (2002) Cell 110:563-74; McManus y Sharp (2002) Nature Rev. Genetics 3:737-47.

La iARN lleva a cabo la degradación del ARNm a través de una ruta endógena que incluye el complejo proteico 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 al complejo silenciador inducido por ARN (RISC). Los ácidos microrribonucleicos (miARN) son moléculas estructuralmente muy similares que se escinden de las 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 Argonata, el componente catalítico del complejo RISC. Se conoce que este proceso se propaga sistémicamente en todo el organismo a pesar de las concentraciones inicialmente limitadas de ARNi y/o miARN en algunos eucariotas tales como plantas, nemátodos, y algunos insectos.

Solamente los transcritos complementarios al ARNi y/o al miARN se escinden y se degradan, y por consiguiente la supresión de la expresión del ARNm es específica de la secuencia. En las plantas, existen diversos grupos funcionales de genes DICER. El efecto de silenciamiento génico de la iARN persiste por días, y bajo condiciones experimentales, puede conducir a una caída en la abundancia del transcrito objetivo del 90 % o más, con la consiguiente reducción de los niveles de la proteína correspondiente. En los insectos, existen al menos dos genes DICER, en donde DICER1 facilita la degradación dirigida por miARN mediante Argonata1. Lee *et al.* (2004) Cell 117(1):69-81. DICER2 facilita la degradación dirigida por ARNi mediante Argonata2.

La Patente de EE.UU. 7,612,194 y las Publicaciones de Patente de EE.UU. núm. 2007/0050860, 2010/0192265, y 2011/0154545 describen una biblioteca de 9112 secuencias de marcadores de secuencia expresada (EST) aisladas de pupas *D. v. virgifera* LeConte. En la Patente de EE.UU. 7,612,194 y la Publicación de Patente de EE.UU. núm. 2007/0050860 se sugiere unir operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una de las diversas secuencias parciales particulares de la H⁺-ATPasa (V-ATPasa) tipo vacuolar de *D. v. virgifera* descrita en estas para la expresión de ARN antisentido

en células vegetales. La Publicación de Patente de EE.UU. núm. 2010/0192265 sugiere unir operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia parcial particular de un gen de *D. v. virgifera* de función desconocida y no descrita (se expresa que la secuencia parcial es 58 % idéntica al producto génico C56C10.3 en *C. elegans*) para la expresión del ARN antisentido en células vegetales. La publicación de Patente de EE.UU. núm. 2011/0154545 sugiere unir operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a dos secuencias parciales particulares de genes de la subunidad beta de coatómero de *D. v. virgifera* para la expresión de ARN antisentido en células vegetales. Además, la Patente de EE.UU. 7,943,819 describe una biblioteca de 906 secuencias de marcadores de secuencia expresada (EST) aisladas de larvas, pupas, e intestinos medios disecados de *D. v. virgifera* LeConte, y sugiere unir operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia parcial particular de un gen de proteína cargada 4b del cuerpo multivesicular de *D. v. virgifera* para la expresión de ARN de doble hebra en células vegetales.

No se proporciona ninguna sugerencia adicional en la Patente de EE.UU. 7,612,194, y las Publicaciones de Patente de EE.UU. núm. 2007/0050860, 2010/0192265, y 2011/0154545 para el uso de alguna secuencia particular de las más de nueve mil secuencias listadas en estas para la interferencia por ARN, que no sean las diversas secuencias parciales particulares de V-ATPasa y las secuencias parciales particulares de genes de función desconocida. Además, ninguna de la Patente de EE.UU. 7,612,194, y las Publicaciones de Patente de EE.UU. núm. 2007/0050860 y 2010/0192265, y 2011/0154545 proporciona alguna guía con respecto a cuál otra de las más de nueve mil secuencias proporcionadas puede ser letal, o incluso de otro modo útil, en las especies de gusanos de la raíz del maíz cuando se usa como ARNdh o ARNip. La Patente de EE.UU. 7,943,819 no proporciona ninguna sugerencia para el uso de alguna secuencia particular de las más de novecientas secuencias listadas en ella para la interferencia por ARN, que no sea la secuencia parcial particular de un gen de proteína cargada 4b del

cuerpo multivesicular. Además, la Patente de EE.UU. 7,943,819 no proporciona ninguna guía con respecto a cuál otra de las más de novecientas secuencias proporcionadas puede ser letal, o incluso de otro modo útil, en especies de gusano de la raíz del maíz cuando se usa como ARNdh o ARNip. La Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2013/040173 y la
5 Publicación de Solicitud PCT núm. WO 2013/169923 describen el uso de una secuencia derivada de un gen de Snf7 de *Diabrotica virgifera* para la interferencia por ARN en el maíz. (También se describe en Bolognesi *et al.* (2012) PLoS ONE 7(10): e47534. doi:10.1371/journal.pone.0047534)

La abrumadora mayoría de las secuencias complementarias a los ADN del gusano de la raíz del
10 maíz (tales como las mencionadas anteriormente) no proporciona un efecto protector para las plantas contra las especies del gusano de la raíz del maíz cuando se usan como ARNdh o ARNip. Por ejemplo, Baum *et al.* (2007) Nature Biotechnology 25:1322-1326, describe los efectos de la inhibición de varios genes objetivo de WCR mediante la iARN. Estos autores informaron que 8 de los 26 genes objetivo probados no pudieron proporcionar una mortalidad
15 en la plaga de coleópteros experimentalmente significativa a una concentración muy alta de ARNi (por ejemplo, ARNdh) de más de 520 ng/cm².

Los autores de la Patente de EE.UU. 7,612,194 y la Publicación de Patente de EE.UU. núm. 2007/0050860 hicieron el primer informe de iARN *in planta* en plantas de maíz dirigida al gusano de la raíz del maíz occidental. Baum *et al.* (2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-6. Estos
20 autores describen un sistema de iARN dietético *in vivo* de alto rendimiento para cribar genes objetivo potenciales para el desarrollo de maíz de iARN transgénico. De un grupo de genes inicial de 290 objetivos, solamente 14 exhibieron potencial para el control de larvas. Uno de los ARN de doble hebra (ARNdh) más efectivos estaba dirigido a un gen que codifica la subunidad A de ATPasa vacuolar (V-ATPasa), y resultó en una supresión rápida del ARNm endógeno
25 correspondiente y activó una respuesta de iARN específica con bajas concentraciones de ARNdh. Por consiguiente, estos autores documentaron por primera vez el potencial para la

iARN *in planta* como una posible herramienta para el manejo de las plagas, mientras que de manera simultánea demostraron que los objetivos efectivos no podían identificarse con exactitud *a priori*, incluso a partir de un conjunto relativamente pequeño de genes candidatos.

5 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

En la presente invención se describen moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, genes objetivo, ADN, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNh), así como los métodos de uso de estas, para el control de plagas de insectos, que incluyen, por ejemplo, plagas de coleópteros, tales como *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; *Meligethes aeneus* Fabricius (escarabajo del polen, "PB"); y *D. speciosa* Germar, y plagas de hemípteros, tales como *Euschistus heros* (Fabr.) (Chinche Café Neotropical, "BSB"); *E. servus* (Say) (Chinche Café); *Nezara viridula* (L.) (Chinche Verde del Sur); *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Chinche Verde Pequeña); *Halyomorpha halys* (Stål) (Chinche Café Marmolada); *Chinavia hilare* (Say) (Chinche Verde); *C. marginatum* (Palisot de Beauvois); *Dichelops melacanthus* (Dallas); *D. furcatus* (F.); *Edessa meditabunda* (F.); *Thyanta perditor* (F.) (Chinche de Hombros Rojos Neotropical); *Horcias nobilellus* (Berg) (Chinche del Algodón); *Taedia stigmosa* (Berg); *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Méneville); *Neomegalotomus parvus* (Westwood); *Leptoglossus zonatus* (Dallas); *Niesthrea sidae* (F.); *Lygus hesperus* (Knight) (Chinche Opaca de las Plantas Occidental); y *L. lineolaris* (Palisot de Beauvois). En ejemplos particulares se describen moléculas de ácidos nucleicos ilustrativas que pueden ser homólogas al menos a una porción de uno o más ácidos nucleicos nativos en una plaga de insectos.

En estos y otros ejemplos adicionales, 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 el desarrollo de larvas/ninfas. 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 este puede ser letal para una plaga de insectos o resultar en la reducción del crecimiento y/o la viabilidad de una plaga de insectos. En ejemplos específicos, el

5 factor de elongación de la transcripción referido en la presente invención como, por ejemplo, *spt5*, o un homólogo de *spt5*, puede seleccionarse como un gen objetivo para el silenciamiento postranscripcional. En ejemplos particulares, un gen objetivo útil para la inhibición postranscripcional es el gen referido en la presente invención como *spt5-1* de *Diabrotica virgifera* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1) *spt5-2* de *D. virgifera* (por ejemplo, SEC.

10 CON NÚM. DE IDENT.:3), *spt5* de *Meligethes aeneus* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101), y/o *spt5-1* de *Euschistus heros* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85). Por lo tanto, en la presente invención se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende el polinucleótido de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; el complemento de la SEC. CON

15 NÚM. DE IDENT.:3; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101; y/o fragmentos de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103, y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104).

20 También se describen moléculas de ácidos nucleicos 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 *stp5*). 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 (SPT5-1 de *D.*

25 *virgifera*), la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4 (SPT5-2 de *D. virgifera*), la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:86 (SPT5-1 de *E. heros*); la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:102 (SPT5 de *M.aeneus*); y/o

una secuencia de aminoácidos dentro de un producto de *spt5-1* de *D. virgifera*, *spt5-2* de *D. virgifera*, *spt5-1* de *E. heros*, o *spt5* de *M. aeneus*. Además se describen moléculas de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido que es el complemento inverso de un polinucleótido que codifica un polipéptido al menos 85 % idéntico a una secuencia de aminoácidos dentro de un producto génico objetivo.

También se describen polinucleótidos de ADNc que pueden usarse para la producción de moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y ARNh) que son complementarias a la totalidad o parte de un gen objetivo de la plaga de insectos, por ejemplo, un gen *spt5*. En modalidades particulares, los ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y/o ARNh pueden producirse *in vitro* o *in vivo* por medio de un organismo genéticamente modificado, tal como una planta o una bacteria. En ejemplos particulares, se describen moléculas de ADNc que pueden usarse para producir moléculas de ARNi que son complementarias a la totalidad o parte de un gen *spt5* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101).

Además se describen medios *spt5* para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros, así como medios *spt5* para proporcionar protección a una planta contra plagas de coleópteros. Un medio *spt5* para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros es una molécula de ARN de una hebra o doble hebra que consiste en un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95-98, 107 y 108; y los complementos de este. Los equivalentes funcionales de los medios *spt5* para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros incluyen moléculas de ARN de una hebra o doble hebra que son sustancialmente homólogas a la totalidad o parte de un ARN transcrito a partir de un gen *spt5* de coleóptero que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103, y/o la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104. Un medio *spt5* para proporcionar protección a una planta contra plagas de

coleópteros es una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un medio *spt5* para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros unido operativamente a un promotor, en donde la molécula de ADN es capaz de integrarse en el genoma de una planta.

- 5 También se describen medios *spt5* para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de hemípteros, así como los medios *spt5* para proporcionar protección a una planta contra plagas de hemípteros. Un medio *spt5* para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de hemípteros es una molécula de ARN de una hebra o doble hebra que consiste en el polinucleótido de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87; y los complementos de este. Los
- 10 equivalentes funcionales de los medios *spt5* 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 ARN transcrito a partir de un gen *spt5* de hemípteros que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87. Un medio *spt5* para proporcionar protección a una planta contra plagas de hemípteros es una molécula de ADN que
- 15 comprende un polinucleótido que codifica un medio *spt5* para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de hemípteros unido operativamente a un promotor, en donde la molécula de ADN es capaz de integrarse en el genoma de una planta.

Adicionalmente, se describen métodos para controlar una población de una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de coleópteros o hemípteros), que comprenden proporcionar a una

20 plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de coleópteros o hemípteros) una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y ARNh) que funciona al ser absorbida por la plaga para inhibir una función biológica dentro de la plaga.

En algunas modalidades, los métodos para controlar una población de una plaga de coleópteros comprenden proporcionar a la plaga de coleópteros una molécula de ARNi que comprende la

25 totalidad o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93; la SEC. CON

NÚM. DE IDENT.:94; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:94; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:96; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:96; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:97; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:97; la SEC. CON

5 NÚM. DE IDENT.:98; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:98; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108; un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido de *spt5* nativo de una plaga de coleópteros (por

10 ejemplo, WCR o PB); el complemento de un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido de *spt5* nativo de una plaga de coleópteros; un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, y 104; el complemento de un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica*

15 que comprende la totalidad o parte de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, y 104; un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101 y 103; el complemento de un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la totalidad o parte de cualquiera

20 de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101 y 103.

En algunas modalidades, los métodos para controlar una población de una plaga de hemípteros comprenden proporcionar a una plaga de hemípteros una molécula de ARNi que comprende la totalidad o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99; la SEC. CON

25 NÚM. DE IDENT.:100; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:100; un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido de *spt5* nativo de una plaga de hemípteros (por

ejemplo, BSB); el complemento de un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido de *spt5* nativo de una plaga de hemípteros; un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85 y 87; y el complemento de un

5 polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85 y 87.

En modalidades particulares, un ARNi que funciona al ser absorbido por una plaga de insectos para inhibir una función biológica dentro de la plaga se transcribe a partir de un ADN que comprende la totalidad o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: la

10 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7; la SEC. CON NÚM. DE

15 IDENT.:8; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; la SEC. CON NÚM. DE

20 IDENT.:104; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, y 104; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, y 104; un polinucleótido codificante

25 nativo de un organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85 y 87; y el complemento de un polinucleótido

codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85 y 87; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101 y 103; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101 y 103.

En la presente invención también se describen métodos en donde los ARNd_h, ARNi_p, ARNh_p, miARN, y/o ARNh pueden proporcionarse a una plaga de insectos en un ensayo basado en la dieta, o en células vegetales genéticamente modificadas que expresan los ARNd_h, ARNi_p, ARNh_p, miARN y/o ARNh. En estos y otros ejemplos adicionales, los ARNd_h, ARNi_p, ARNh_p, miARN, y/o ARNh pueden ingerirse por la plaga. La ingestión de los ARNd_h, ARNi_p, ARNh_p, miARN, y/o ARNh de la invención pueden resultar entonces en la iARN en la plaga, lo 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. Por consiguiente, se describen métodos en donde moléculas de ácidos nucleicos que comprenden polinucleótidos ilustrativos útiles para el control de plagas de insectos se proporcionan a una plaga de insectos. En ejemplos particulares, una plaga de coleópteros y/o hemípteros controlada por medio del uso de las moléculas de ácidos nucleicos de la invención puede ser WCR, NCR, SCR, *D. undecimpunctata howardi*, *D. balteata*, *D. undecimpunctata tenella*, *D. speciosa*, *D. u. undecimpunctata*, *Meligethes aeneus*, BSB, *E. servus*; *Nezara viridula*; *Piezodorus guildinii*; *Halyomorpha halys*; *Chinavia hilare*; *C. marginatum*; *Dichelops melacanthus*; *D. furcatus*; *Edessa meditabunda*; *Thyanta perditor*; *Horcias nobilellus*; *Taedia stigmosa*; *Dysdercus peruvianus*; *Neomegalotomus parvus*; *Leptoglossus zonatus*; *Niesthrea sidae*; *Lygus hesperus*; o *L. lineolaris*.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** incluye una representación de la estrategia usada para generar ARNdh a partir de una única plantilla de transcripción con un único par de cebadores.

- 5 La **Figura 2** incluye una representación de la estrategia usada para generar ARNdh a partir dos plantillas de transcripción.

LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias de ácidos nucleicos que se relacionan en el listado de secuencias adjunto se
10 muestran con el uso de las abreviaturas de letras estándares para las bases de nucleótidos, tal como se define en el 37 C.F.R. § 1,822. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos listadas definen moléculas (es decir, polinucleótidos y polipéptidos, respectivamente) que tienen los monómeros de nucleótidos y aminoácidos dispuestos en la manera descrita. Cada una de las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos listadas también define el género de
15 polinucleótidos o polipéptidos que comprenden los monómeros de nucleótidos y aminoácidos dispuestos en la manera descrita. En vista de la redundancia del código genético, se entenderá que una secuencia de nucleótidos que incluye una secuencia codificante también describe el género de polinucleótidos que codifican el mismo polipéptido que un polinucleótido que consiste en la secuencia de referencia. Se entenderá además que una secuencia de aminoácidos
20 describe el género de los ORF de polinucleótidos que codifican dicho polipéptido.

Solamente se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria se incluye mediante cualquier referencia a la hebra mostrada. Dado que el complemento y el complemento inverso de una secuencia primaria de ácido nucleico se describen necesariamente mediante la secuencia primaria, la secuencia complementaria y la
25 secuencia complementaria inversa de una secuencia de ácido nucleico se incluyen mediante cualquier referencia a la secuencia de ácido nucleico, a menos que se indique de manera

explícita de otro modo (o que sea evidente de otro modo a partir del contexto en el cual aparece la secuencia). Además, tal como se entiende en la técnica que la secuencia de nucleótidos de una hebra de ARN está determinada por la secuencia del ADN a partir de la cual se transcribió (excepto por la sustitución de las nucleobases de uracilo (U) por timina (T)), una secuencia de ARN se incluye mediante cualquier referencia a la secuencia de ADN que la codifica. En el listado de secuencias adjunto:

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 muestra un cóntigo que contiene un ADN de *spt5* de WCR ilustrativo, referido en la presente invención en algunos casos como *spt5* de WCR o *spt5-1* de WCR:

10 GGCAGTTTGAAGCACAGTAAAAACCAACAGTTTGAAGGTTTTCTGTTTCTGTGGTTTTGGAA
ATTTAATAGAAACAAGAATTGTATTCTTGTATTAATAATTATCACAGCTTCGCTTTACTTAAAC
TTAATTTATAATTTATAGAAGACACGATGAATACTCAAACCGCAACATAACCTATTCACTAAT
ATTCAGTGTACAAAATAGCAAATATGTCTGATTCGGAGGGTAGCAACTTTTCGGATAACGAA
AATGCGTCTGCAGCGGGGTCGGTAAGGTCCCGCAGCTCAAGAGGTAGCGTTTGAAGTAGA
15 TCTAGATCCCCGTCTAGATCCAGGTCGAGATCCATGTGCGAAAAGTAGATCGAGATCACCAT
CAAGAGGCTCAAGAATGTCCAGATCCAGATCACGGTCTCCCTCTCGTTCAAGATCAAGATC
ACCTTCTAGATCTCGGTCTCGTTCACGCTCCCGATCGAAATCTAGATCACGAAGCAGGTCC
AGGAGCAGATCGGCAAGATCTGGATCAGAAGCAAAAGAAGCTTCAGGTCCTGAGGATGTT
GTGGAGGAAGAAGAACCAGATGGAGATAGTCTAAGGTCAGACGAATATGACAGTGAAGAA
20 GATGAAAGTGATGATGGGGGTAGAGCAAAGAAAAGGAAAAAGAATAAAGACAGATATGGCG
GATTTATTATTGACGAAGCTGAGGTAGATGACGAAGTTGAAGATGAAGATGAATGGGAAGA
TGGAGCACAAGAAATTGGAATTGTTCTAACGAAGTTGACGAGTTTGGACCTACAGCAAGA
GAAATTGAAGGAAGAAGAAGAGGAACAAATTTATGGGATGCTCAGAAGGAATCAGAAATTG
AGGAATACCTAAAAAGAAAATATGCTGATGATGGAGCAGCAATCAAACATTTTGGAGATGGC
25 GGTGAAGAAATGTCAGATGAAATCACACAACAAACATTATTGCCAGGTGTTAAAGATCCCAA
CTTGTGGATGGTCAAGTGTAGAATTGGAGAGGAAAAATCTACTTGCCTCTTACTTATGCGAA

AGTTTTTGGCTTACCAAAATACCAATGAACCTTTGCAAATCAAGTCAGTAGTAGCACCTGAA
 GGTGTAAAGGATACATATATATTGAAGCCTACAAACAACCTCATGTCAAGGCTGCTATCCA
 GAATGTGGGAAATTTAAGAATGGGTATCTGGAAACAGCAGATGGTTCCCATCAAGGAAATG
 ACGGATGTTTTAAGAGTTGTGAAAGAACAACCTGGTTTGAAATCAAAACAGTGGGTAAGGCT
 5 TAAGCGAGGTCTTTACAAAGATGACATTGCCCAAGTCGATTATTTTGATATGGCACAAAATC
 AGGTACATCTTAAATTTTACCAAGAATTGACTACACACGTTTGAGAGGAGCCCTAAGAACA
 GCACAAACAGAATCTGAAGCAGAAAAGCGCAAGAAAAAACGCCGCCCTCCCAGTAAACCTT
 TCGATCCTGAAGCTATCAGAGCCATAGGTGGTGAAGTTACGTCCGATGGTGACTTTTTAATC
 TTTGAAGGTAATCGTTACTCACGCAAGGGCTTTCTATACAAAATTTTACCCTCAGCGCCGT
 10 TATAATTGATGGTGTTAAGCCGACCTTGGCAGAACTGGAAAGGTTCGAAGAACAACCTGAA
 GGAATCGATTTGGAATTGTCCGTGGATAAAGAGGAGAAAGCTGTTACTCATTCAATCAGCG
 CGGGAGATAACGTTGAAGTTTGTGAAGGTGAATTGATCTATTTGCAGGGTAAAATCATCAGC
 ATCGATGGACACATGATAACCGTAATGCCCAAACACGAGGATTTGAAAGAGGCATTGGTGT
 TTCAAGCTTATGAATTGAAGAAGTATTTCAAACCTGGAGATCATGTAAAAGTTTTGGCAGGG
 15 CGCTATGAAGGAGACACTGGTTTGGTAGTCAGAGTAGAAAATAACAGAGTCGTATTGATAT
 CTGACCTGACTATGCACGAAATGGAAATTCTACCAAAGACTTACAATTATGTACTGATATG
 GCTAGTGGTGTGATTCACTAGGTAAATTCGAATGGGGTGATCTTGTAACCTGGATGCTG
 AAACCTGTTGGAGTTATTATTAGGTTGGAAAGGGAAAATTTCCATGTTTTGAATATGCACGGC
 AAAGTTGTTGAATGCAGGCCTGGATCGTTACAGAAGAGAAGGATCCATAAATACACTGCAG
 20 CCTTGGATTCATACCGGAACAATTTACATAGAAGAGATATGGTCAAAGTAATCGATGGGCCA
 CATTCTGGATTTTCTGGAGAAATTAACATCTCTATAGAAATTTCGCATTTCTCTACTCAGTG
 GAATTTTTGCAAATGGTGGTATATTTGTGTGCAAACCTAAGCATCTTCAGTTGGCTGGAGG
 CAACAAGAACATGCCTTCTGCAGATATTGGCATTGGAATGGAGTTTATGTCCCCGAGAAGA
 AGTTCTCCAATGCATCCATCAAGTGGTGGAGGTGCAGCCGGAGCAGCTTTCCGTGCCTTTG
 25 GAGCTGGTAGACCTGCTGGTGGAGCCGGTAGAGGAAGAGGGAGCAGAGATAGAGATCTTA
 TCGGTACAACCATCAAAATTATTAGAGGGCCTTATAAGGGCAATATTGGTATAGTAAAAGAT

GTTACTCAAAGTTCAGTCAGGATAGAGTTGCATACATCTTGTCAAACCTATATCTGTGGATAA
 GAACCACATTAATGATGTCTGGAGCTCCAAGCGGTAGAGATGGCAGCGCTTCCAGTTATGGC
 AAAACTCCAGCATACGCGGGTAACCAGACTCCTTTGTACAGAGATTCTGGCAACAAAACCTC
 CCATGTGCGATTCTGGGTCTCGTACCCCCTTGCATTATGGTTCAATGACTCCGATTACGA
 5 CGGTTCTAGGACACCAAATGCTAGTTCAGAATGGGATCCTGCGGTCTCTGGTAATACTTAT
 CCATCACCAGGATATACTCCTAGTACTCCAGGCTATCAAGCCAACGGTCCATATACGCCTC
 AAACACCTGGTACAATGTACGATGGCAGCTACAGTCCATATCAGGCGAGTCCTGGATATCA
 AAGCGCCATTTCCACTCCCAGTCCCGGAACCGGATACGGCCAGTCTCCTGCTTCTAGCAAC
 AATCCGTACAGCACTCCCAGTTCTGGGTATAGCCCGAACATGCCGTACAATCCTCAAACCTC
 10 CCGGTGCAGGTCTGGATGTGCTACCTATGACTGATTGGCATACCGTCGATATTGAGGTAAG
 AATTCGCGATAGTCATGATGATCCTGGCTTAGTTGGTCAAACCTGGCGTTATTAGAAGCATAT
 CTGCAGCTATGTGTACAGTTTTCTTCCTGAAGAAGATAGAGTTGTAAACATCATATGCGAT
 CATCTAGATCCAGTACGGCCACAAAGAGGAGATCAGTTTAAGGTAATTATTGGGGAAGAAC
 GAGAGCAAACCTGGCGAACTTCTTTCTATAGATGCAAACGAAGGAGTAGTTAAAATTAAGGAC
 15 GATATTACTATGCTGCCCTTACAAAATTTATGCAAGATGAGGCCCTCAGGTCAAAAAAATAT
 GTAACTTTTTGAATACGTTAAGTTGTACGTTGATTGTGAACGTGAAAATAATTTGGATTCTGA
 TTTTAGGTAATATAATAAAAAATAAATATATGTGCAATGTATTTGACAATTATAAAAAATAGAGTA
 TTAGTAGTCAAAAAAACAA

20 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido
 SPT5 codificado por un ADN de SPT5 de WCR, referido en la presente invención en algunos
 casos como SPT5 de WCR o SPT5-1 de WCR:

MSDSEGSNFSDNENASAAGSVRSRSSRGSVRSRSPSRSRSRMSKSRSRSPSRGSRMSR
 SRSRSPSRSRSPSRSRSRSRSRSRSKSRSRSRSRSRARSRGSEAKEASGPEDVVEEEEPDGD
 25 SLRSDEYDSEEDSDDGGRAKKRKKNKDRYGGFIIDEAEVDDEVEDEDEWEDGAQEIGIVPNE
 VDEFGPTAREIEGRRRGTNLWDAQKESEIEEYLKRKYADDGAAIKHFGDGGEEMSDEITQQTLL

PGVKDPNLWMVKCRIGEEKSTCLLLMRKFLAYQNTNEPLQIKSVVAPEGVKGYIYIEAYKQPHV
 KAAIQNVGNLRMGIWKQQMVPKEMTDVLRVVKEQTGLKSKQWVRLKRGLYKDDIAQVDYFDM
 AQNQVHLKILPRIDYTRLRGALRTAQTESEAEKRKKRRPPSKPFDPEAIRAIGGEVTS DGDFLIF
 EGNRYSRKGFYK NFTLSAVIDGVKPTLAELERFEEQPEGIDLELSVDKEEKAVTHSFSAGDNV
 5 EVCEGELIYLQGKIISIDGHMITVMPKHEDLKEALVFQAYELKKYFKTGDHVKVLAGRYEGDTGL
 VVRVENNRVVLISDLTMHEMEILPKDLQLCTDMASGVDSLKGFEWGDLVNLD AETVGVIIRLERE
 NFHVLNMHGKVVECRPGSLQKRRIHKYTAALDSYRNNLHRRDMVKVIDGPHSGFSGEIKHLYR
 NFAFLYSVEFLQNGGIFVCKTKHLQLAGGNKNMPSADIGIGMEFMSPRRSSPMHPSSGGAAG
 AAFGAFGAGRPAGGAGRGRGSRDRDLIGTTIKIIRGPYKGNIGIVKDVTQSSVRIELHTSCQTISV
 10 DKNHINDVGAPSGRDGSASSYGKTPAYAGNQTPLYRDSGNKTPMCDSGSRTPLHYGSMTPIH
 DGSRTPNASSEWDP AVSGNTYPSPGYTPSTPGYQANGPYTPQTPGTMYDGSYSPYQASPGY
 QSAISTPSPGTGYGQSPASSNNPYSTPSSGYSPNMPYNPQTPGAGLDVLPMTDWHTVDIEVRI
 RDSHDDPGLVGQTGVIRSISAAMCTVFLPEEDRVVNIICDHLDPVRPQRGDQFKVIIGEEREQTG
 ELLSIDANEGVVKIKDDITMLPLQNLCKMRPSGQKNM

15

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3 muestra un cóntigo que comprende un ADN de *spt5* de WCR
 ilustrativo adicional referido en la presente invención en algunos casos como *spt5-2* de WCR:

GTGGATTCAATTATTGACGAGGCTGAAGTTGACGATGAGGTGGACGAAGATGATGAATACGA
 AGATGAGAACGAGCTTGGGATCGTTAATGAAGTAGATGAATTGGGACCGACAGCTAGAGAA
 20 ATTGAGATCCGACGACGTGGCAATCTGTGGGACAATCAAAAGGAAGACGAAATTGAAGAAT
 ATCTGAAGAAGCGATATGCTGATGAATCGATCGCACGTCGACATTTCCGTGATGGCGGTGA
 AGAGATGTCCGACGAAATTACACAGCAGACGTTGCTGCCGACAATCAAGGATCCCAATTTG
 TGGATGGTGAAATGTGCGATCGGCGAGGAAAAGATAACTGCACTGCTGTTGATGCGCAAAT
 TTTTGACATACCAAAACACCGACGAACCGCTGCAAATAAAAGCGGTTGTTGCACCGGAAGG
 25 TGTCAAAGGATACATCTACGTGGAAGCATTCAAACAGACGCATGTAAAGGCATCCATCAATA
 ACGTCAGTAATTTACGAATGGGACAATGGAAACAGGAAATGGTGCCAATCAAGGAAATGAC

AGACGTTCTGAAGGTTGTCAAAGAACAGACTGGCCTGAAACCGAAACAATGGGTTCGTCTA
 AAACGCAGTCAGTACAAAGATGACATTGCGCAAGTGGACTACGTGGACATGGCACAAAATC
 AAGTTCATTTAAAACTGCTGCCACGTATCGATTACACTCGATTGCGCGGTGCCCTGAGAAC
 AACGCAGACTGATGCCGATGATGCGAAGCGCAAACGGAAACGTCGTCCACCAGCAAAACC
 5 ATTCGATCCGGAAGCCATTCGAGCGATCGGCGGTGAGGTCACATCTGATGGTGACTTTTTTA
 GTGTTGAGGGAAATCGTTACTCCCGCAAAGGATTCTTGTACAAGAATTTATTATCTCGGC
 CATTCTGTCGGAAGGTGTGAAGCCAAC

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido
 10 SPT5 de WCR adicional codificado por un ADN de *spt5* de WCR ilustrativo (es decir, *spt5-2*):
 GFIDEAEVDDEVDDEDEYEDENELGIVNEVDELGPTAREIEIRRRGNLWDNQKEDEIEEYLKKR
 YADESIARRHFGDGGEEMSDEITQQTLLPTIKDPNLWMVKCRIGEEKITALLMRKFLTYQNTDE
 PLQIKAVVAPEGVKGYIYVEAFKQTHVKASINNVSNLRMGQWKQEMVPIKEMTDVLKVVKQEQTG
 LKPKQWVRLKRSQYKDDIAQVDYVDMAQNQVHLKLLPRIDYTRLRGALRTTQTDADDAKRKRK
 15 RRPPAKPFDPEAIRAIGGEVTSDGDFLVFEGNRYSRKGFLYKNFIISAILSEGVKP

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5 muestra un ADN de *spt5* de WCR ilustrativo, referido en la
 presente invención en algunos casos como reg1 (región 1) de *spt5-1* de WCR, que se usa en
 algunos ejemplos para la producción de un ARNdH:
 20 GAATTGAAGAAGTATTTCAAACTGGAGATCATGTAAAAGTTTTGGCAGGGCGCTATGAAG
 GAGACACTGGTTTGGTAGTCAGAGTAGAAAATAACAGAGTCGTATTGATATCTGACCTGACT
 ATGCACGAAATGGAAATTCTACCAAAGACTTACAATTATGTACTGATATGGCTAGTGGTGT
 CGATTCACTAGGTAAATTCGAATGGGGTGATCTTGTAACCTGGATGCTGAAACTGTTGGA
 GTTATTATTAGGTTGGAAAGGGAAAATTTCCATGTTTTGAATATGCACGGCAAAGTTGTTGA
 25 ATGCAGGCCTGGATCGTTACAGAAGAGAAGGATCCATAAATACTGCAGCCTTGGATTCA

TACCGGAACAATTTACATAGAAGAGATATGGTCAAAGTAATCGATGGGCCACATTCTGGATT
TTCTGGAGAAATTAACATCTCTATAGAAATTTGCATTTCTCTACTC

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6 muestra un ADN de *spt5* de WCR ilustrativo adicional,
5 referido en la presente invención en algunos casos como reg1 (región 1) de *spt5-2* de WCR,
que se usa en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

GTCGCATCGGCGAGGAAAAGATAACTGCACTGCTGTTGATGCGCAAATTTTTGACATACCA
AAACACCGACGAACCGCTGCAAATAAAAGCGGTTGTTGCACCGGAAGGTGTCAAAGGATAC
ATCTACGTGGAAGCATTCAAACAGACGCATGTAAAGGCATCCATCAATAACGTCAGTAATTT
10 ACGAATGGGACAATGGAAACAGGAAATGGTGCCAATCAAGGAAATGACAGACGTTCTGAAG
GTTGTCAAAGAACAGACTGGCCTGAAACCGAAACAATGGGTTCGTCTAAAACGCAGTCAGT
ACAAAGATGACATTGCGCAAGTGGACTACGTGGACATGGCACAAAATCAAGTTCATTTAAAA
CTGCTGCCACGTATCGATTACACTCGATTGCGCGGTGCCCTGAGAACAACGCAGACTGATG
CCGATGATGCGAAGCGCAAACGGAAACGTCGTCCACCAGCAAAACCATTG

15

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7 muestra un ADN de *spt5* de WCR ilustrativo adicional,
referido en la presente invención en algunos casos como v1 (versión 1) de *spt5-1* de WCR, que
se usa en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

AGAGTAGAAAATAACAGAGTCGTATTGATATCTGACCTGACTATGCACGAAATGGAAATTCT
20 ACCAAAAGACTTACAATTATGTACTGATATGGCTAGTGGTGTGATTCACTA

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8 muestra un ADN de *spt5* de WCR ilustrativo adicional,
referido en la presente invención en algunos casos como v2 (versión 2) de *spt5-1* de WCR, que
se usa en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh

25 TACCGGAACAATTTACATAGAAGAGATATGGTCAAAGTAATCGATGGGCCACATTCTGGATT
TTCTGGAGAAATTAACATCTCTATAGAAATTTGCATTTCTCTAC

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

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

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:11-18 muestran los cebadores usados para amplificar porciones de secuencias de *spt5* de WCR ilustrativas que comprenden reg1 de *spt5-1*, reg1 de *spt5-2*, v1 de *spt5-1*, y v2 de *spt5-1*, usadas en algunos ejemplos para la producción de ARNdh.

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

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

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 espectralina 2*.

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

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 NÚM. DE IDENT.:26-53 muestran los cebadores usados para amplificar regiones génicas de *anexina*, *beta espectralina 2*, *mtRP-L4*, y *YFP* para la síntesis de ARNdh.

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 cebador T20VN.

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:56-66 muestran los cebadores y sondas usados para el análisis de la expresión de los transcritos de ARNdh en maíz.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:67 muestra una secuencia de nucleótidos de una porción de una región codificante de *SpecR* usada para la detección de la estructura principal del vector binario.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:68 muestra una secuencia de nucleótidos de una región
5 codificante de *AAD1* usada para el análisis del número de copias genómicas.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 69 muestra una secuencia de ADN de un gen *invertasa* de maíz.

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:70-78 muestran las secuencias de nucleótidos de los oligonucleótidos de ADN usados para las determinaciones del número de copias génicas y la
10 detección de la estructura principal del vector binario.

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79-84 muestran los cebadores y sondas usados para el análisis de la expresión de los transcritos de ARNdh en maíz.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85 muestra un ADN de *spt5* de BSB ilustrativo, referido en la presente invención en algunos casos como *spt5-1* de BSB:

15 AGAAATCATAGATAGTGGCAGGAAAATTAAAACGGTGTTGGCCCTTGGAACCGTTGGAAGA
AATCAGTATGGCCCGAAGGCTGAAAAGTTTGGAGACCCCTGGATTAGAGAATAGAATTTCA
CCCCAATGGTAATCTCTAATAGTCAATATTGCTGTAAATTGAATAATAGTTTAATGATTCTTT
GTTAACAGGTGGAAGTTCTGCTTATGCTGCTTCGGCATCTCCAGGTAGTGGAATAGGACCT
TTTGGAACACCTTCCCCTACATCATAACAGTCCACGCACTCCAGGGAGCAGTGCATCTCCTT
20 ATCAATCTAGTTCAGATTCATCTGATGGAGATTGGGTTACGACTGGTATTGAAGTCCGTATA
AAAGATTCGCACGATGATGATGGCTTATCTGGACAACTGGAAGTGTCAAAACAGTATCTG
GAGGAATGTGTACACTTTTCTTGTTGGCTGAAGACAGGACTGTTACCATCACAAGTGATAGA
TTGGCACCAGTAAAACCACAACAGAATGATACAGTGAAGGTGATCAAAGGGAAAAAAGACA
AGGATCAGACTGGCAGGCTTGTTTCAATTGATCATGTTGAGGGCGTTGTCAGTTTCAGTAAT
25 GGAGAATTAAACATGTTCCCAATGGATTTTCTATGTAAATGTCCGCTGGTAGCCAATAGGT
GTTTTGGTTTCTAATTATTAATAAATTAAGTTCTTTACTTTATTCTGTTATAGTATCAAATGCAG

TTATTTGTGTATTCCTGTCTTATATTATTAAATTCAGCTTTTGCTTCTAAATGATGAAATC
TTAATTTCTTTTTTTTTTAAGAACATATAAATGCAAAATATTATTTTAAAAAAGGTGAAT

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:86 muestra la secuencia de aminoácidos de un
5 polipéptido SPT5 de BSB codificado por un ADN de *spt5* de BSB ilustrativo (es decir, *spt5-1* de BSB):

FNDLLTGGSSAYAASASPGSGIGPFGTPSPTSYSPTPGSSASPYQSSSDSSDGDWVTTGIE
VRIKDSHDDDGLSGQTGTVKTVSGGMCTFLLAEDRTVTITSDRLAPVKPQQNDTVKVIKGGKD
KDQTGRLVSIHVEGVVSFSNGELNMFPMDFLCKMSAGSQ

10

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87 muestra un ADN de *spt5* de BSB ilustrativo, referido en la
presente invención en algunos casos como reg1 (región 1) de BSB_*spt5-1*, que se usa en
algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

CCTTTTGGAACACCTTCCCCTACATCATACAGTCCACGCACTCCAGGGAGCAGTGCATCTC
15 CTTATCAATCTAGTTCAGATTCATCTGATGGAGATTGGGTTACGACTGGTATTGAAGTCCGT
ATAAAAGATTGCGACGATGATGATGGCTTATCTGGACAACTGGAACTGTCAAAACAGTATC
TGGAGGAATGTGTACACTTTTCTTGTTGGCTGAAGACAGGACTGTTACCATCACAAGTGATA
GATTGGCACCAGTAAAACCACAACAGAATGATACAGTGAAGGTGATCAAAGGGAAAAAAGA
CAAGGATCAGACTGGCAGGCTTGTTTCAATTGATCATGTTGAGGGCGTTGTCAGTTTCAGT
20 AATGGAGAATTAAACATGTTCCCAATGGATTTTCTATGTAAATGTCCGCTGGTAGCCAATA
GGTGTGTTTGGTTTCTAATTATTAATAAATTAAGTTCTTTACTTTATTCTGTTATAGTATCAAATG
C

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:88-89 muestran los cebadores usados para amplificar
25 porciones de secuencias de *spt5* de BSB ilustrativas que comprenden la reg1 de *spt5-1* usadas
en algunos ejemplos para la producción de ARNdh.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:90 muestra un ADN de v2 de *YFP* ilustrativo, que se usa en algunos ejemplos para la producción de la hebra sentido de un ARNdh.

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:91-92 muestran los cebadores usados para la amplificación por PCR de la secuencia de *YPF YFP* v2, usada en algunos ejemplos para la producción de ARNdh.

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93-100 muestran ARN ilustrativos transcritos a partir de ácidos nucleicos que comprenden polinucleótidos de *spt5* ilustrativos y fragmentos de estos.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101 muestra una secuencia de cóntigo de ADN que comprende *spt5* de *Meligethes aeneus*:

```
10 ATGTCGGATTCTGAAGCTAGTAACTTTTCGGATAACGAAAATGCCTCGGAGGCGGGTTCAG
TGAGATCAGGTTCTCGTAGCCGATCAAGATCGGTTTCCAAATCTCGATCTAGATCTCCAAGT
AGGTCTAGAAGTAGATCAAGGGGTCTGAAGTAGATCACGATCCAGATCGAGGTCAAGATCTG
GTAGTAGATCTGCTAGATCAGGTTCTGAAGCTCGCGAAGCTTCTGGTAATGAAGAGGTTGC
TGATGAGGAGGAACCTGAAGGTGATAGTTTAAATGAGTATGACAGTGAAGAAGATGAATCG
15 GACGATGGTAGACATGCTAAAAACGTAAAAAGGATAGGTTTCGTGATTTTATTATTGATGA
AGCTGAAGTTGATGACGAGGTTGAAGACGAAGATGAATGGGAAGACGGAGCCCAAGAGAT
TGGAATTGTCCCCAATGAAGTGGACGAATTTGGTCCGACAGCCAGAGAAATTGAAGGGAGA
CGAAGAGGAACTAACCTTTGGGACGCTCAGAAAGAGCATGAAATCGAGGAGTATCTAAGGA
AAAAGTATGCTGATGACAGTGTTGCCGCTAAACATTTTCGGAGATGGTGGGGAGGAGATGTC
20 CGACGAGATTACTCAGCAAACCTCTGTTACCTGGTGTAAGACCCAAATCTGTGGATGGTA
AAATGCCGCATCGGCGAGGAAAAATCCACGTGCTTGCTGCTCATGCGCAAATTCCTCGCCT
ACCAAAACACGAACGAACCCCTCCAAATAAAATCGGTCTAGCGCCCGAGGGCGTCAAAG
GCTACATCTACATCGAGGCCTTCAACATCCGCACGTCAAGGCGGCCATCGAAAACGTGCG
GCAACCTGCGCATGGGCATGTGGAAGCAGCAAATGGTGCCGATCAAAGAGATGACGGACG
25 TTTTGAGGGTGGTTAAGGAGCAGACGGGGTTGAAGTCCAGGCAGTGGGTGAGGTTGAAGA
GGGGGTTGTACAAGGACGATATCGCGCAGGTGGATTATTTTCGATATGGCGCAGAATCAGG
```

TGCATTTGAAGTTGCTGCCCAGGATTGATTATACAAGGTTGAGGGGCGCGTTGAGGACTAC
GCAGTCGGAATCTGAAGCAGAAAAACGAAAGAAAAAAGAAGACCACCAAGCAAACCTTTT
GACCCAGAAGCCATTAGAGCTATTGGTGGTGAGGTCACGCAAGATGGTGACTTCCTTATTT
TTGAAGGAAACAGATATTCCCGAAAAGGTTTCTTGTACAAGAACTTCACCATGAGCGCTGTT
5 CTCATAGAAGGAGTGAAGCCAACTTTGGCAGAACTCGAAAGATTTGAAGAACAACCGGAAG
GAATCGATTTGGAACCTTCGACAGAAAAAGAAGACAAAGCTGTAACGCATTCTTTTAGTGCT
GGAGACAATGTGGAAGTTTCAGAGGGAGAATTGATTAACCTACAGGGTAAAATCGTGAGCA
TAGACGGCTCGATGATCACGGTGATGCCCAAACACGAAGAACTAAAAGATCCCTTAGTATT
CCAAGCTAACGAACTGAGAAAGTACTTCAAATGGGCGACCACGTCAAAGTTCTCTCCGGT
10 AGATATGAAGGAGACACCGGACTAATTGTTGCGCTGGAAAACAACCGCGTTGTTTTAATTC
CGACCTGACTATGCACGAGATGGAAATTTTGCCCAAAGATTTGCAACTTTGCACTGACATG
GCGTCTGGGGTGGATTCCCTAGGTAAATTCGAGTGGGGAGATCTCGTAAATCTCGACGCA
GAAACTGTTGGTGTTATTGTACGATTGGAACGAGAAAATTTCCACGTTCTAAATATGCACGG
CAAAGTAGTGGAGGTGCGCCCAGGTTCCCTGCAAAAACGCCGCCTTAATCGTTTTACGGC
15 GGCGCTCGATTCCTACAGAAACAACTTGCACCGCCGCGACATGGTCAAAGTGATCGACGG
ACCGCATAACGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTCGCGTTTTTGTA
CTCCGTCACTTTCCTGCAAAACGGCGGTATTTTCGTCTGCAAAACCAAACATCTGCAGCTAG
CGGGCGGTAATAAGACGCTGCCAGTGCAGAAATCGGTTGCGGGATGGAGTTTATGTCTC
CGAGGAGAGCCAGTCCGATGCATCCATCGAGTGGAGGCGGCGGTGCAGCAGGAGGAGGA
20 GGAGGAGGTGGTGGAGGCGGAGGTTTCGGCGGCGGCGGCCGAGGCGGTGCGCACGGC
GGCGGCGGCAGAGGACGCGCGACACGCGATCGCGATCTTATCGGCACGACCATTAAAATT
ACGCGCGGCCCTACAAAGGCAACATCGGAATCGTCAAGGACGCCACGCAGAGCACCGCT
CGTATCGAGCTCCACACTTCCTGTCAAACGATCTCCGTGACAGAAACAACATCGCTGACG
TCGGAGCTACCAAAGATACCGCAGGTAGCGCCACCAGTTACGGCAGAACCCCGGCCTACA
25 CCGGAAACCAGACTCCGTTGTACAGGGAATCGGGCAACAAAACCTCCGATGTGCGACTCTG
GCGGTTCTCGCACGCCTCTGCATTACGGTTCCATGACTCCATTACACGATGGGTGAGGAC

ACCCAACGCTGGGTCCGAATGGGACGCCTCTGTCTCGCAGGCGTACCCAAGTCCTGGGTA
 CGATCCCAGTACCCCGGCCTACCAGGTCAACGGGCCGTTTACACCGCAGACTCCAGGTAC
 AATGTACGAATCCACGTACAGTCCTTACCAGACAAGCCCAGGCTATCAAAGCGCCATCTCT
 ACGCCAAGTCCAGGAACTGGCTACGGCCAATCTCCGGCCAGCAACAACCCATACAACACC
 5 CCAAGCTCCGGTTACAGTCCGGCTTACAACCCGCAAACGCCCGGAGCCGGTCTGGATATT
 CTACCGATGACCGATTGGCATAAGTGGACATTGAGGTTAGGATTCGCGACGGCGATTCC
 GGTTTGGTCGGCCAAACCGGCGTTATTAGGAGCATTTCCGGGGCAATGTGCTCCGTGTTTT
 TACCGGAGGAAGACAGGGTTGTCAATATTATGTCCGATCATTTGGATCCCGTAAGGCCGCA
 GAGAGGGGACGATTTTAAGGTTATAATAGGAGAAGAAAGAGAAGCGACAGGGGAATTATTA
 10 TCCATAGATCTTCACGAAGGGGTTGTGAAAATAAAAGAAGAAATAAAGATGTTGCCGTTACA
 AAATCTCTGCAAGATGCGCAAAGATCATTGA

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:102 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína
 SPT5 de *Meligethes aeneus*.

MSDSEASNFSNENASEAGSVRSGSRSRSVSKSRSRSPSRSRSRGRSRSRSRSRSR
 15 GSR SARSGSEAREASGNEEVADEEEPEGDSLNEYDSEEDSDDGRHAKKRKKDRFRDFIIDEA
 EVDDVEDEDEWEDGAQEIGIVPNEVDEFGPTAREIEGRRRGTNLWDAQKEHEIEEYLRKKYA
 DDSVAAKHFGDGGEEMSDEITQQTLLPGVKDPNLWMVKCRIGEEKSTCLLLMRKFLAYQNTNE
 PLQIKSVVAPEGVKGYIYIEAFKHPHVKAAIENVGNLRMGMWKQQMVPIKEMTDVLRVVKEQTG
 LKSRQWVRLKRGLYKDDIAQVDYFDMAQNQVHLKLLPRIDYTRLRGALRTTQSESEAEKRKKK
 20 RRPPSKPFDPEAIRAIGGEVTQDGDFLIFEGNRYSRKGLYKNFTMSAVLIEGVKPTLAELERFE
 EQPEGIDLELPTEKEDKAVTHSFSAGDNVEVSEGELINLQGKIVSIDGSMITVMPKHEELKDPLVF
 QANELRKYFKMGDHVKVLSGRYEGDTGLIVRVENNRVVLISDLTMHEMEILPKDLQLCTDMASG
 VDSLKGFEWGDLVNLD AETVGIVRLERENFHVLMH GKVV EVRPGSLQKRRLNRFTAALDSY
 RNNLHRRDMVKVIDGPHNFAFLYSVTFLQNGGIFVCKTKHLQLAGGNKTLPSAEIGSGMEFMSP
 25 RRASPMHPSSGGGGAAGGGGGGGGGGGGGFGGGGRGGAHGGGGRGRATRDRDLIGTTIKITR
 GPYKGNIGIVKDATQSTARIELHTSCQTISVDRNNIADV GATKDTAGSATS YGRTPAYTGNQTPL

YRESGNKTPMCDSSGSRTPPLHYGSMTPLHDGSRTPNAGSEWDASVSQAYPSPGYDPSTPAY
QVNGPFTPQTPGTMYESTYSPYQTSPGYQSAISTPSPGTGYGQSPASNNPYNTPSSGYSPAY
NPQTPGAGLDILPMTDWH TVDIEVRIRDGDSGLVGQTGVIRSISGAMCSVFLPEEDRVVNIMSD
HLDPVRPQRGDDFKVIIGEEREATGELLSIDLHEGVVKIKEEIKMLPLQNLCKMRKDH

5

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103 muestra la reg1 de *spt5* de *M. aeneus* usada para la producción de ARNdh.

GGAAGACGGAGCCCAAGAGATTGGAATTGTCCCCAATGAAGTGGACGAATTTGGTCCGAC
AGCCAGAGAAATTGAAGGGAGACGAAGAGGAACTAACCTTTGGGACGCTCAGAAAGAGCA
10 TGAAATCGAGGAGTATCTAAGGAAAAAGTATGCTGATGACAGTGTTGCCGCTAAACATTTTCG
GAGATGGTGGGGAGGAGATGTCCGACGAGATTACTCAGCAAACCTCTGTTACCTGGTGTA
AGACCCAAATCTGTGGATGGTAAAATGCCGCATCGGCGAGGAAAAATCCACGTGCTTGCTG
CTCATGCGCAAATTCCTCGCCTACCAAACACGAACGAACCCCTCCAAATAAAATCGGTGCG
TAGCGCCCGAGGGCGTCAAAGGCTACATCTACATCGAGGCCTTCAAACATCCGCACGTC

15

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104 muestra un ADN de *spt5* de WCR ilustrativo adicional, referido en la presente invención en algunos casos como v3 (versión 3) de *spt5-1* de WCR, que puede usarse en algunos ejemplos para la producción de ARNdh:

TACCGGAACAATTTACATAGAAGAGATATGGTCAAAGTAATCGATGGGCCACATTCTGGATT
20 TTCTGGAGAAATTAAACATCTCTATAGAAATTTGCGATTTCTCTACTC

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:105 muestra un polinucleótido enlazador ilustrativo, que forma un “bucle” cuando se transcribe a un transcrito de ARN para formar una estructura de horquilla:

AGTCATCACGCTGGAGCGCACATATAGGCCCTCCATCAGAAAGTCATTGTGTATATCTCTCA
25 TAGGGAACGAGCTGCTTGCGTATTTCCCTTCCGTAGTCAGAGTCATCAATCAGCTGCACCG
TGTCGTAAAGCGGGACGTTGCGCAAGCTCGT

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106-108 muestran ARN ilustrativos adicionales transcritos a partir de ácidos nucleicos que comprenden polinucleótidos de *spt5* ilustrativos y fragmentos de estos.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Descripción general de las diversas modalidades

Desarrollamos la interferencia por ARN (iARN) como una herramienta para el manejo de plagas de insectos, con el uso de una de las especies de plagas objetivo más probable para las plantas transgénicas que expresan ARNdh; el gusano de la raíz del maíz occidental. Hasta ahora, la

10 mayoría de los genes propuestos como objetivos para la iARN en larvas del gusano de la raíz en realidad no logran su propósito. En la presente invención, describimos la supresión de *spt5* mediada por iARN en las plagas de insectos ilustrativas, gusano de la raíz del maíz occidental, escarabajo del polen, y chinche café neotropical, que ha demostrado tener un fenotipo letal

15 cuando, por ejemplo, las moléculas de ARNi se administran mediante ingestión o inyección de ARNdh de *spt5*. En modalidades de la presente invención, la capacidad de administrar ARNdh de *spt5* mediante la alimentación de los insectos confiere un efecto de iARN que es muy útil para el manejo de plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Mediante la combinación de la iARN mediada por *spt5* con otros objetivos de iARN útiles (por ejemplo,

20 objetivos de iARN de *ROP*, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 14/577,811, objetivos de iARN de *ARN polimerasa II*, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/133,214, objetivos de iARN de *ARN polimerasa II140*, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 14/577,854, objetivos de iARN de *ARN polimerasa II215*, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/133,202,

25 objetivos de iARN de *ARN polimerasa II33*, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/133,210), objetivos de iARN de *ncm*, tal como se describe en la Solicitud de

Patente de EE.UU. núm. 62/095487, objetivos de iARN de *Dre4*, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 14/705,807, objetivos de iARN de *COPI alfa*, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/063,199, objetivos de iARN de *COPI beta*, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/063,203, objetivos de iARN de *COPI gamma*, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/063,192, objetivos de iARN de *COPI delta*, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/063,216, y objetivos de iARN del *factor de elongación de la transcripción spt6*, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. núm.62/168606), el potencial de afectar múltiples secuencias objetivo, por ejemplo, en gusanos de la raíz (por ejemplo, larvas de gusano de la raíz), puede aumentar las oportunidades de desarrollar enfoques sustentables para el manejo de plagas de insectos que involucran tecnologías de iARN.

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

Por consiguiente, algunas modalidades involucran la inhibición específica de secuencia de la expresión de productos génicos objetivo, con el uso de ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN y/o ARNh que es complementario a las secuencias codificantes y/o no codificantes del gen o genes objetivo para lograr al menos el control parcial de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Se describe un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos aisladas y purificadas que comprenden un polinucleótido, por ejemplo, tal como se establece en una de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; 3; 85; y 101; y fragmentos de estas. En algunas modalidades una molécula de ARNdh estabilizada puede expresarse a partir de estos polinucleótidos, fragmentos de estos, o un gen que comprende uno de estos polinucleótidos, para el silenciamiento o inhibición postranscripcional de un gen objetivo. En ciertas modalidades, las moléculas de ácidos nucleicos aisladas y purificadas comprenden la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 85, y 101 (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8, 87, 103, y 104), y/o un complemento de estas.

Algunas modalidades involucran una célula huésped recombinante (por ejemplo, una célula vegetal) que tiene en su genoma al menos un ADN recombinante que codifica al menos una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh). En modalidades particulares, una o más moléculas de ARNdh codificadas pueden proporcionarse cuando se ingieren por una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) para el silenciamiento o inhibición postranscripcional de la expresión de un gen objetivo en la plaga. El ADN recombinante puede comprender, por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 85, 87, 101, 103, y 104; fragmentos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 85, 87, 101, 103, y 104; y un polinucleótido que consiste en una secuencia parcial de un gen que comprende una de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 85, 87, 101, 103, y 104; y/o complementos de estas.

Algunas modalidades involucran una célula huésped recombinante que tiene en su genoma un ADN recombinante que codifica al menos una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh) que comprende la totalidad o parte de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93, la SEC. CON NÚM. DE

IDENT.:94, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99, o la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106 (por ejemplo, al menos un polinucleótido seleccionado de un grupo que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95-98, 100, 107, y 108), o el complemento de estas. Cuando se ingiere(n) por una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), la(s) molécula(s) de ARNi puede(n) silenciar o inhibir la expresión de un ADN de *spt5* objetivo (por ejemplo, un ADN que comprende la totalidad o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 85, 87, 101, 103, y 104)) en la plaga o en la progenie de la plaga, y de este modo resulta en el cese del crecimiento, el desarrollo, la viabilidad y/o la alimentación de la plaga.

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

Algunas modalidades involucran un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de la plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros o hemípteros). En estas y otras

25 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

5 objetivo en una célula de la plaga de insectos 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 bajo condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo de células vegetales que comprende una pluralidad de células vegetales transformadas; (c) seleccionar una célula

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

15 Por consiguiente, también se describe una planta transgénica que comprende un vector integrado en su genoma que tiene un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNdh, en donde la planta transgénica comprende la molécula de ARNdh codificada por el polinucleótido del vector. En modalidades particulares, la expresión de una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNdh en la planta es suficiente para

20 modular la expresión de un gen objetivo en una célula de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros o hemípteros) que se pone en contacto con la célula vegetal o planta transformada (por ejemplo, al alimentarse de la planta transformada, una parte de la planta (por ejemplo, la raíz) o célula vegetal), de manera que se inhibe el crecimiento y/o la supervivencia de la plaga. Las plantas transgénicas descritas en la presente invención pueden mostrar protección y/o

25 protección mejorada contra las infestaciones de plagas de insectos. Las plantas transgénicas particulares pueden mostrar protección y/o protección mejorada contra una o más plagas de

coleópteros y/o hemípteros seleccionadas del grupo que consiste en: WCR; BSB; NCR; SCR; MCR; *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; *D. speciosa* Germar; *Meligethes aeneus* Fabricius; *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-Méneville); *Neomegalotomus parvus* (Westwood); *Leptoglossus zonatus* (Dallas); *Niesthrea* *sidae* (F.); *Lygus hesperus* (Knight); y *L. lineolaris* (Palisot de Beauvois).

En la presente invención también se describen métodos para administrar agentes de control, tales como una molécula de ARNi, a una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Tales agentes de control pueden causar, de manera directa o indirecta, un deterioro en la capacidad de una población de una plaga de insectos de alimentarse, crecer, o de otro modo causar daño en un huésped. En algunas modalidades se proporciona un método que comprende administrar una molécula de ARNdh estabilizada a una plaga de insectos para suprimir al menos un gen objetivo en la plaga, para causar de este modo la iARN y reducir o eliminar el daño a la planta en un huésped de la plaga. En algunas modalidades, un método para inhibir la expresión de un gen objetivo en la plaga de insectos puede resultar en el cese del crecimiento, la supervivencia, y/o el desarrollo de la plaga.

En algunas modalidades se proporcionan composiciones (por ejemplo, una composición tópica) que comprenden una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh) para su uso en plantas, animales, y/o el medio ambiente de una planta o animal para lograr la eliminación o reducción de una infestación de 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. Algunas modalidades comprenden poner a disposición de la plaga la composición nutritiva o la 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 que a su vez puede resultar en la inhibición de la expresión de al menos un gen objetivo en la(s) célula(s) de la plaga. La ingestión de o el daño a una planta o célula vegetal por parte de una infestación de plaga de insectos puede limitarse o eliminarse en o sobre cualquier tejido huésped o medio ambiente en el cual la plaga esté presente mediante la provisión de una o más composiciones que comprenden una molécula de ARNi en el huésped de la plaga.

Los cebos de iARN se forman cuando el ARNdh se mezcla con alimentos o un agente de atracción o ambos. Cuando las plagas comen el cebo, también consumen el ARNdh. Los cebos pueden tener la forma de gránulos, geles, polvos fluidizables, líquidos, o sólidos. En otra modalidad, el gen *spt5* puede incorporarse en una formulación de cebo tal como se describe en la Patente de EE.UU. núm. 8,530,440 que se incorpora de este modo como referencia. Generalmente, los cebos se colocan en o alrededor del medio ambiente de la plaga de insectos, por ejemplo, WCR puede ponerse en contacto con el cebo, y/o ser atraído, hacia este.

Las composiciones y métodos descritos en la presente invención pueden usarse juntos en combinaciones con otros métodos y composiciones para controlar el daño causado por plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Por ejemplo, una molécula de ARNi tal como se describe en la presente invención para la protección de 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 dicha plaga, rotación del cultivo, técnicas genéticas recombinantes que exhiben características diferentes de las características de los métodos mediados por la iARN así como composiciones de iARN (por ejemplo, producción recombinante de proteínas en plantas que son dañinas para una plaga de insectos (por ejemplo, toxinas *Bt* y polipéptidos PIP-1 (Ver la Publicación de Patente de EE.UU. núm. US 2014/0007292 A1)), y/o la expresión recombinante de otras moléculas de ARNi.

II. Abreviaturas

	BSB	chinche café neotropical (<i>Euschistus heros</i>)
	ARNdh	ácido ribonucleico de doble hebra
	GI	inhibición del crecimiento
5	NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
	ADNg	ADN genómico
	ARNi	ácido ribonucleico inhibidor
	ORF	marco abierto de lectura
10	iARN	interferencia por ácido ribonucleico
	miARN	ácido microrribonucleico
	ARNhp	ácido ribonucleico de horquilla pequeño
	ARNip	ácido ribonucleico inhibidor pequeño
	ARNh	ácido ribonucleico de horquilla
15	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)
	PB	escarabajo del polen (<i>Meligethes aeneus</i> Fabricius)
20	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
	qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
	RISC	complejo silenciador inducido por ARN
	SCR	gusano de la raíz del maíz del sur (<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> Barber)
	SEM	error estándar de la media
25	YFP	proteína fluorescente amarilla

III. Términos

En la descripción y las tablas a continuación, se usan una serie de términos. Para proporcionar un entendimiento claro y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, que incluyen el alcance que se le dará a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones:

Canola: Los términos colza, colza de semillas oleaginosas, semilla de colza, y canola se usan indistintamente en la presente invención y se refieren a una planta de la especie *Brassica*; por ejemplo, *B. napus*.

Plaga de coleópteros: Tal como se usa en la presente invención, el término “plaga de coleópteros” se refiere a los insectos de las plagas del orden Coleóptera, que incluyen los insectos de las plagas del género *Diabrotica*, que se alimentan de los cultivos agrícolas y los productos del cultivo, que incluyen el maíz y otras gramíneas verdaderas. En ejemplos particulares, una plaga de coleópteros se selecciona de una lista que comprende *D. v. virgifera* LeConte (WCR); *D. barberi* Smith y Lawrence (NCR); *D. u. howardi* (SCR); *D. v. zea* (MCR); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; *D. speciosa* Germar, y *Meligethes aeneus* Fabricius.

Contacto (con un organismo): Tal como se usa en la presente invención, el término “contacto con” o “captación por” un organismo (por ejemplo, una plaga de coleópteros o hemípteros), con relación 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 parte del organismo (por ejemplo, mediante alimentación); el contacto del organismo con una composición que comprende la molécula de ácido nucleico; y el remojo de los organismos con una solución que comprende la molécula de ácido nucleico.

Cóntigo: Tal como se usa en la presente invención el término “cóntigo” se refiere a una secuencia de ADN que se reconstruye a partir de un conjunto de segmentos de ADN superpuestos que se derivan de una única fuente genética.

Planta de maíz: Tal como se usa en la presente invención, el término “planta de maíz” se refiere a una planta de la especie, *Zea mays* (maíz).

Expresión: Tal como se usa en la presente invención, la “expresión” de un polinucleótido codificante (por ejemplo, un gen o un transgén) se refiere al proceso por medio del cual la información codificada de una unidad transcripcional de ácido nucleico (que incluye, por ejemplo, ADN_g o ADN_c) se convierte en una parte operativa, no operativa, o estructural de una célula, que incluye a menudo la síntesis de una proteína. La expresión génica puede afectarse por señales externas; por ejemplo, exposición de una célula, tejido, u organismo a un agente que aumenta o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen también puede regularse en cualquier punto en la ruta de ADN a ARN a proteína. La regulación de la expresión génica se produce, por ejemplo, a través de controles que actúan en la transcripción, traducción, transporte y procesamiento del ARN, la degradación de moléculas intermediarias tales como ARNm, o a través de la activación, inactivación, compartimentación, o degradación de moléculas de proteínas específicas después de producirlas, o mediante combinaciones de estos. La expresión génica puede medirse a nivel del ARN o a nivel de la proteína por medio de cualquier método conocido en la técnica, que incluye, sin limitación, transferencia Northern, RT-PCR, transferencia Western, o ensayo(s) de la actividad de la proteína *in vitro*, *in situ* o *in vivo*.

Material genético: Tal como se usa en la presente invención, el término “material genético” incluye todos los genes, y moléculas de ácidos nucleicos, tales como ADN y ARN.

Plaga de hemípteros: Tal como se usa en la presente invención, el término “plaga de hemípteros” se refiere a los insectos de las plagas del orden Hemiptera, que incluyen, por ejemplo y sin limitación, insectos de las familias Pentatomidae, Miridae, Pyrrhocoridae, Coreidae, Alydidae, y Rhopalidae, que se alimentan de una gran variedad de plantas huéspedes y tienen partes de la boca que perforan y succionan. En ejemplos particulares, una plaga de hemípteros se selecciona de la lista que comprende, *Euschistus heros* (Fabr.) (Chinche Café Neotropical), *Nezara viridula* (L.) (Chinche Verde del Sur), *Piezodorus guildinii*

(Westwood) (Chinche Verde Pequeña), *Halyomorpha halys* (Stål) (Chinche Café Marmolada), *Chinavia hilare* (Say) (Chinche Verde), *Euschistus servus* (Say) (Chinche Café), *Dichelops melacanthus* (Dallas), *Dichelops furcatus* (F.), *Edessa meditabunda* (F.), *Thyanta perditor* (F.) (Chinche de Hombros Rojos Neotropical), *Chinavia marginatum* (Palisot de Beauvois), *Horcias nobilellus* (Berg) (Chinche del Algodón), *Taedia stigmosa* (Berg), *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Méneville), *Neomegalotomus parvus* (Westwood), *Leptoglossus zonatus* (Dallas), *Niesthrea sidae* (F.), *Lygus hesperus* (Knight) (Chinche Opaca de las Plantas Occidental), y *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois).

Inhibición: Tal como se usa en la presente invención, el término “inhibición”, cuando se usa para describir un efecto en un polinucleótido codificante (por ejemplo, un gen), se refiere a una disminución medible en el nivel celular del ARNm transcrito a partir del polinucleótido codificante y/o del péptido, polipéptido, o proteína producido a partir 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 afectación consiguiente de la expresión de otros polinucleótidos codificantes (por ejemplo, genes) en la célula en donde se lleva a cabo la inhibición específica.

Insecto: Tal como se usa en la presente invención con relación 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* seleccionada 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. En algunas modalidades, el término también incluye algunas otras plagas de insectos, por ejemplo, plagas de insectos hemípteros.

Aislado: Un componente biológico “aislado” (tal como un ácido nucleico o una proteína)

sustancialmente se ha separado, producido aparte, o purificado por separado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en la cual el componente se produce naturalmente (es decir, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, así como 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 los enlaces químicos que conectan el ácido nucleico al ADN restante en el cromosoma). Las moléculas de ácidos nucleicos y las proteínas que se han “aislado” incluyen moléculas de ácidos nucleicos y proteínas purificadas por medio de métodos de purificación estándares. El término también abarca los ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante la expresión recombinante en una célula huésped, así como también moléculas de ácidos nucleicos, proteínas, y péptidos sintetizadas químicamente.

Molécula de ácido nucleico: Tal como se usa en la presente invención, el término “molécula de ácido nucleico” puede referirse a una forma polimérica de nucleótidos, que puede incluir tanto hebras sentido como antisentido de ARN, ADNc, ADNg, y formas sintéticas y polímeros mixtos de los antes mencionados. Un nucleótido o nucleobase puede referirse a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una “molécula de ácido nucleico” tal como se usa en la presente invención, es sinónimo de “ácido nucleico” y “polinucleótido”. Una molécula de ácido nucleico tiene usualmente al menos 10 bases de longitud, a menos que se indique específicamente de otro modo. Por costumbre, la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico se lee del extremo 5' al 3' de la molécula. El “complemento” de una molécula de ácido nucleico se refiere a un polinucleótido que tiene nucleobases que pueden formar pares de bases con las nucleobases de la molécula de ácido nucleico (es decir, A-T/U, y G-C).

Algunas modalidades incluyen ácidos nucleicos que comprenden un ADN plantilla que se transcribe a una molécula de ARN que es el complemento de una molécula de ARNm. En estas modalidades, el complemento del ácido nucleico transcrito a la molécula de ARNm está

presente en la orientación 5' a 3', de manera que la ARN polimerasa (que transcribe el ADN en la dirección 5' a 3') transcribirá un ácido nucleico a partir del complemento que puede hibridarse a la molécula de ARNm. A menos que se indique explícitamente de otro modo, o sea evidente de otro modo a partir del contexto, el término “complemento” se refiere, por lo tanto, a un polinucleótido que tiene nucleobases, de 5' a 3', que pueden formar pares de bases con las nucleobases de un ácido nucleico de referencia. De manera similar, a menos que se indique explícitamente de otro modo (o sea evidente de otro modo a partir del contexto), el “complemento inverso” de un ácido nucleico se refiere al complemento en la orientación inversa. Lo anteriormente mencionado se demuestra en la ilustración siguiente:

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

Algunas modalidades de la invención pueden incluir moléculas de ARNi formadoras de ARN de horquilla. En estas moléculas de ARNi, tanto el complemento de un ácido nucleico que será objetivo de la interferencia por ARN como el complemento inverso pueden encontrarse 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 los polinucleótidos complementario y complementario inverso.

Las “moléculas de ácidos nucleicos” incluyen todos los polinucleótidos, por ejemplo: formas de ADN de una hebra y de doble hebra; formas de ARN de una hebra; y formas de ARN de doble hebra (ARNdh). El término “secuencia de nucleótidos” o “secuencia de ácido nucleico” se refiere a ambas hebras sentido y antisentido de un ácido nucleico ya sea como hebras únicas individuales o en el dúplex. El término “ácido ribonucleico” (ARN) es inclusivo de ARNi (ARN inhibidor), ARNdh (ARN de doble hebra), ARNip (ARN interferente pequeño), ARNhp (ARN de horquilla pequeño), ARNm (ARN mensajero), miARN (micro ARN), ARNh (ARN de horquilla), ARNt (ARN de transferencia, ya sean cargados o descargados con un aminoácido acilado

correspondiente), y ARNc (ARN complementario). El término “ácido desoxirribonucleico” (ADN) es inclusivo de ADNc, ADNg, y de los híbridos de ADN-ARN. Los expertos en la técnica entenderán que los términos “polinucleótido”, “ácido nucleico”, y “fragmentos” de estos son términos que incluyen ADNg, ARN ribosómicos, ARN de transferencia, ARN mensajeros, operones, polinucleótidos manipulados genéticamente más pequeños que codifican o pueden adaptarse para que codifiquen péptidos, polipéptidos, o proteínas.

Oligonucleótido: Un oligonucleótido es un polímero de ácido nucleico corto. Los oligonucleótidos pueden formarse por escisión de segmentos de ácidos nucleicos de mayor longitud, o mediante la polimerización de nucleótidos precursores individuales. Los sintetizadores automatizados permiten la síntesis de oligonucleótidos de hasta varios cientos de bases de longitud. Debido a que los oligonucleótidos pueden unirse a un ácido nucleico complementario, estos 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 ADN. En la PCR, el oligonucleótido se refiere por lo general como un “cebador”, el cual permite que una ADN polimerasa extienda el oligonucleótido y replique la hebra complementaria.

Una molécula de ácido nucleico puede incluir tanto nucleótidos producidos naturalmente como modificados, o cualquiera de estos tipos, unidos entre sí por medio de enlaces nucleotídicos producidos naturalmente y/o no naturalmente. Las moléculas de ácidos nucleicos pueden modificarse químicamente o bioquímicamente, o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, tal como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos producidos naturalmente con un análogo, modificaciones internucleótidos (por ejemplo, enlaces no cargados: por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, *etc.*; enlaces cargados: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, *etc.*; fracciones pendientes: por ejemplo, péptidos; intercaladores: por ejemplo, acridina, psoraleno, *etc.*;

quelantes; alquilantes; así como enlaces modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, *etc.*). El término “molécula de ácido nucleico” también incluye cualquier conformación topológica, que incluye las conformaciones de una hebra, de doble hebra, parcialmente bicatenario, tricatenario, de horquilla, circular, y en candado.

5 Tal como se usa en la presente invención con respecto al ADN, el término “polinucleótido codificante”, “polinucleótido estructural”, o “molécula de ácido nucleico estructural” se refiere a un polinucleótido que se traduce finalmente a un polipéptido, mediante transcripción y ARNm, cuando se coloca bajo el control de los elementos reguladores apropiados. Con relación al ARN, el término “polinucleótido codificante” se refiere a un polinucleótido que se traduce a un
10 péptido, polipéptido o proteína. Los límites de un polinucleótido codificante están determinados por un codón de iniciación 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; EST; así como polinucleótidos recombinantes.

Tal como se usa en la presente invención, “polinucleótido no codificante transcrito” se refiere a
15 segmentos de moléculas de ARNm tales como 5'UTR, 3'UTR, y segmentos de intrón que no se traducen a un péptido, polipéptido, o proteína. Además, “polinucleótido no codificante transcrito” se refiere a un ácido nucleico que se transcribe a un ARN que funciona en la célula, por ejemplo, ARN estructurales (por ejemplo, ARN ribosómico (ARNr) tal como se ejemplifica por ARNr 5S, ARNr 5.8S, ARNr 16S, ARNr 18S, ARNr 23S, y ARNr 28S, y similares); ARN de
20 transferencia (ARNt); y ARNnp tales como U4, U5, U6, y similares. Los polinucleótidos no codificantes transcritos también incluyen, por ejemplo y sin limitación, ARN pequeños (ARNp), cuyo término se usa a menudo para describir los ARN no codificantes bacterianos pequeños; ARN nucleolares pequeños (ARNnop); microARN; ARN interferentes pequeños (ARNip); ARN asociados a Piwi (ARNpi); y ARN no codificantes largos. Aún más, “polinucleótido no codificante
25 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 letal por ARN: Tal como se usa en la presente invención, el término “interferencia letal por ARN” se refiere a la interferencia por ARN que resulta en la muerte o en una reducción en la viabilidad del individuo en cuestión al cual se administra, por ejemplo, un ARNdh, miARN, ARNip, ARNhp, y/o ARNh.

5 Genoma: Tal como se usa en la presente invención, el término “genoma” se refiere al ADN cromosómico que se encuentra dentro del núcleo de una célula, y también se refiere al ADN organelar que se encuentra dentro de los componentes subcelulares de la célula. En algunas modalidades de la invención, una molécula de ADN puede introducirse en una célula vegetal, de manera que la molécula de ADN se integre en el genoma de la célula vegetal. En estas y
10 otras modalidades adicionales, la molécula de ADN puede integrarse en el ADN nuclear de la célula vegetal, o integrarse en el ADN del cloroplasto o mitocondria de la célula vegetal. El término “genoma”, tal y como se aplica a las bacterias, se refiere tanto al cromosoma como a los plásmidos dentro de la célula bacteriana. En algunas modalidades de la invención, una molécula de ADN puede introducirse en una bacteria de manera que la molécula de ADN se
15 integre en el genoma de la bacteria. En estas y otras modalidades adicionales, la molécula de ADN puede integrarse en el cromosoma o ubicarse como un plásmido estable o en un plásmido estable.

Identidad de secuencias: El término “identidad de secuencias” o “identidad”, tal como se usa en la presente invención en el contexto de dos polinucleótidos o polipéptidos, se refiere a los
20 residuos en las secuencias de las dos moléculas que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación específica.

Tal como se usa en la presente invención, el término “porcentaje de identidad de secuencias” puede referirse al valor determinado mediante la comparación de dos secuencias alineadas de manera óptima (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos) de
25 una molécula en una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, espacios) en

comparación con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones ni eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante la determinación del número de posiciones en las cuales el residuo de nucleótido o aminoácido idéntico aparece en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, 5 división del número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicación del resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencias. Una secuencia que es idéntica en cada posición en comparación con una secuencia de referencia se dice que es 100 % idéntica a la secuencia de referencia, y viceversa.

10 En la técnica son muy conocidos los métodos de alineamiento de secuencias para su comparación. Diversos programas y algoritmos de alineamiento se describen, por ejemplo, en: Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:2444; Higgins y Sharp (1988) *Gene* 73:237-44; Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-3; Corpet *et al.* (1988) *Nucleic* 15 *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 cálculos de homología puede encontrarse, por ejemplo, en Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

20 La herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales (BLAST™; Altschul *et al.* (1990)) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI); está disponible a partir de diversas fuentes, que incluyen el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Bethesda, MD), y en la internet, para su uso junto con varios programas de análisis de secuencias. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencias con el uso de este programa se encuentra disponible en la internet en la sección “ayuda” para BLAST™. Para comparaciones 25 de secuencias de ácidos nucleicos, puede usarse la función “Blast 2 sequences” del programa BLAST™ (Blastn) con el uso de la matriz predeterminada BLOSUM62 configurada para los

parámetros predeterminados. Los ácidos nucleicos con una similitud de secuencia aún mayor respecto a las secuencias de los polinucleótidos de referencia mostrarán un porcentaje de identidad creciente cuando se evalúan por medio de este método.

Específicamente hibridable/específicamente complementario: Tal como se usa en la presente invención, los términos “específicamente hibridable” y “específicamente complementario” son términos que indican un grado suficiente de complementariedad de manera que se produzca la unión estable y específica entre la molécula de ácido nucleico y una molécula de ácido nucleico objetivo. La hibridación entre dos moléculas de ácidos nucleicos involucra la formación de un alineamiento antiparalelo entre las nucleobases de las dos moléculas de ácidos nucleicos. Después, las dos moléculas son capaces de formar enlaces de hidrógeno con bases correspondientes en la hebra opuesta para formar una molécula bicatenaria que, si es suficientemente estable, puede detectarse con el uso de métodos muy conocidos en la técnica. Un polinucleótido no necesita ser 100 % complementario a su ácido nucleico objetivo para ser específicamente hibridable. Sin embargo, la cantidad de complementariedad que debe existir para que la hibridación sea específica es una función de las condiciones de hibridación usadas. Las condiciones de hibridación que resultan en grados particulares de rigor variarán en dependencia de la naturaleza del método de hibridación elegido así como de la composición y longitud de los ácidos nucleicos que se hibridan. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{++}) del tampón de hibridación determinarán el rigor de la hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen sobre el rigor. Los cálculos con relación a las condiciones de hibridación que se requieren para obtener grados particulares de rigor son conocidos por los expertos en la técnica, y se discuten, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (ed.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^{da} 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. Instrucciones y guías más detalladas con relación a la hibridación de los ácidos nucleicos pueden encontrarse, 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.

5 Tal como se usa en la presente invención, las "condiciones rigurosas" abarcan las condiciones bajo las cuales la hibridación se producirá solamente si hay menos de 20 % de discrepancia entre la secuencia de la molécula de hibridación y un polinucleótido homólogo dentro de la molécula de ácido nucleico objetivo. Las "condiciones rigurosas" incluyen niveles de rigor particulares adicionales. Por consiguiente, tal como se usa en la presente invención, las

10 condiciones de "rigor moderado" son aquellas bajo las cuales los polinucleótidos con más de 20 % de discrepancia en la secuencia no hibridarán; las condiciones de "rigor elevado" son aquellas bajo las cuales los polinucleótidos con más de 10 % de discrepancia no hibridarán; y las condiciones de "rigor muy elevado" son aquellas bajo las cuales los polinucleótidos con más de 5 % de discrepancia no hibridarán.

15 Las siguientes son condiciones representativas, no limitantes, de la hibridación.

Condición de rigor elevado (detecta polinucleótidos que comparten al menos 90 % de identidad de secuencias): Hibridación en tampón SSC 5x a 65 °C durante 16 horas; lavar dos veces en tampón SSC 2x a temperatura ambiente durante 15 minutos cada vez; y lavar dos veces en tampón SSC 0.5x a 65 °C durante 20 minutos cada vez.

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

Condición de control no riguroso (los polinucleótidos que comparten al menos 50 % de identidad

25 de secuencias hibridarán): Hibridación en tampón SSC 6x de temperatura ambiente a 55 °C

durante 16-20 horas; lavar al menos dos veces en tampón SSC 2x-3x de temperatura ambiente a 55 °C durante 20-30 minutos cada vez.

Tal como se usa en la presente invención, el término “sustancialmente homólogo” u “homología sustancial”, con relación a un ácido nucleico, se refiere a un polinucleótido que tiene

5 nucleobases contiguas que se hibridan bajo condiciones rigurosas al ácido nucleico de referencia. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que son sustancialmente homólogos a un ácido nucleico de referencia de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y 3-5 son aquellos ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones rigurosas (por ejemplo, las condiciones de rigor moderado establecidas, *supra*) al ácido nucleico de referencia. Los polinucleótidos

10 sustancialmente homólogos pueden tener al menos 80 % de identidad de secuencias. Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener de aproximadamente 80 % a 100 % de identidad de secuencias, tal como 79 %; 80 %; aproximadamente 81 %; aproximadamente 82 %; aproximadamente 83 %; aproximadamente 84 %; aproximadamente 85 %; aproximadamente 86 %; aproximadamente 87 %; aproximadamente 88 %;

15 aproximadamente 89 %; aproximadamente 90 %; aproximadamente 91 %; aproximadamente 92 %; aproximadamente 93 %; aproximadamente 94 % aproximadamente 95 %; aproximadamente 96 %; aproximadamente 97 %; aproximadamente 98 %; aproximadamente 98.5 %; aproximadamente 99 %; aproximadamente 99.5 % y aproximadamente 100 %. La propiedad de homología sustancial está estrechamente relacionada con la hibridación específica. Por

20 ejemplo, una molécula de ácido nucleico es específicamente hibridable cuando hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del ácido nucleico a los polinucleótidos no objetivo bajo condiciones donde se desea la unión específica, por ejemplo, bajo condiciones rigurosas de hibridación.

Tal como se usa en la presente invención, el término “ortólogo” se refiere a un gen en dos o

25 más especies que ha evolucionado a partir de un ácido nucleico ancestral común, y puede retener la misma función en las dos o más especies.

Tal como se usa en la presente invención, se dice que dos moléculas de ácidos nucleicos exhiben “complementariedad completa” cuando cada nucleótido de un polinucleótido que se lee en la dirección 5' a 3' es complementario a cada nucleótido del otro polinucleótido cuando se lee en la dirección 3' a 5'. Un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido de referencia exhibirá una secuencia idéntica al complemento inverso del polinucleótido de referencia. Estos términos y descripciones están bien definidos en la técnica y se entienden fácilmente por los expertos en la técnica.

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

El término, “unido operativamente”, cuando se usa con referencia a un elemento regulador genético y un polinucleótido codificante, quiere decir 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/ cantidad de transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o la traducción del polinucleótido codificante asociado. Los elementos reguladores pueden incluir promotores; líderes de traducción; intrones; potenciadores; estructuras de tallo y bucle; polinucleótidos de unión 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 unido operativamente a estos. Además, 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: Tal como se usa en la presente invención, el término “promotor” se refiere a una región de ADN que puede estar corriente arriba del inicio de la transcripción, y que puede
5 participar en el reconocimiento y unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un promotor puede estar unido operativamente a un polinucleótido codificante para su expresión en una célula, o un promotor puede estar unido operativamente a un polinucleótido que codifica un péptido señal que puede estar unido operativamente a un polinucleótido codificante para su expresión en una célula. Un “promotor vegetal” puede ser un
10 promotor capaz de iniciar la transcripción en las células vegetales. Los ejemplos de promotores bajo el control del desarrollo incluyen promotores que preferentemente inician la transcripción en ciertos tejidos, tales como hojas, raíces, semillas, fibras, vasos del xilema, traqueidas, o esclerénquima. Dichos promotores se refieren como “preferidos del tejido”. Los promotores que inician la transcripción solamente en ciertos tejidos se refieren como “específicos del tejido”. Un
15 promotor “específico del tipo celular” principalmente activa la expresión en ciertos tipos celulares en uno o más órganos, por ejemplo, células vasculares en raíces u hojas. Un promotor “inducible” puede ser un promotor que puede estar bajo control ambiental. Los ejemplos de condiciones ambientales que pueden iniciar la transcripción mediante promotores inducibles incluyen las condiciones anaeróbicas así como la presencia de la luz. Los promotores
20 específicos del tejido, preferidos del tejido, específicos del tipo celular e inducibles constituyen la clase de promotores “no constitutivos”. Un promotor “constitutivo” es un promotor que puede estar activo bajo la mayoría de las condiciones ambientales o en la mayoría de los tejidos o tipos celulares.

Cualquier promotor inducible puede usarse en algunas modalidades de la invención. Ver Ward
25 *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:361-366. Con un promotor inducible, la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Los promotores inducibles ilustrativos incluyen,

pero no se limitan a: Promotores del sistema ACEI que reaccionan al cobre; el gen *In2* del maíz que reacciona a los protectores herbicidas de bencenosulfonamida; el represor Tet de Tn10; y el promotor inducible de un gen de hormona esteroide, cuya actividad transcripcional puede inducirse por una hormona glucocorticoesteroide (Schena *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88:0421).

Los promotores constitutivos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: Promotores de virus de plantas, tales como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV); promotores de los genes de actina del arroz; promotores de ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 de maíz; y el promotor de ALS, fragmento *XbaI/NcoI* en 5' respecto 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 del tejido o preferido del tejido en algunas modalidades de la invención. Las plantas transformadas con una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido codificante unido operativamente a un promotor específico del tejido pueden producir el producto del polinucleótido codificante exclusivamente, o preferentemente, en un tejido específico. Los promotores específicos del tejido o preferidos del tejido ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: Un promotor preferido de semillas, tal como el del gen de faseolina; un promotor específico de hojas e inducido por la luz tal como el de *cab* o *rubisco*; un promotor específico de anteras tal como el de *LAT52*; un promotor específico del polen tal como el de *Zm13*; y un promotor preferido de microesporas tal como el de *apg*.

Planta de soja: Tal como se usa en la presente invención, el término “planta de soja” se refiere a una planta de la especie *Glycine*, por ejemplo, *G. max*.

Transformación: Tal como se usa en la presente invención, el término “transformación” o “transducción” se refiere a la transferencia de una o más moléculas de ácidos nucleicos a una célula. Una célula se “transforma” por una molécula de ácido nucleico transducida en la célula cuando la molécula de ácido nucleico se replica establemente en la célula, ya sea mediante la

incorporación de la molécula de ácido nucleico en el genoma celular, o mediante la replicación episomal. Tal como se usa en la presente invención, 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: transfección con vectores virales; 5 transformación con vectores plasmídicos; electroporación (Fromm *et al.* (1986) *Nature* 319:791-3); lipofección (Felgner *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 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 del ADN; y bombardeo con microprojectiles (Klein *et al.* (1987) *Nature* 327:70).

10 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 ARNdh que comprende un polinucleótido que es complementario a una molécula de ácido nucleico que se encuentra en una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En ejemplos adicionales, un transgén puede ser un polinucleótido antisentido, en donde la expresión del polinucleótido antisentido 15 inhibe la expresión de un ácido nucleico objetivo, para producir de este modo un fenotipo de iARN. En otros ejemplos adicionales, 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 unidos operativamente a un polinucleótido 20 codificante del transgén (por ejemplo, un promotor).

Vector: Una molécula de ácido nucleico conforme se introduce a una célula, por ejemplo, para producir una célula transformada. Un vector puede incluir elementos genéticos que le permiten replicarse en la célula huésped, tales como un origen de replicación. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a: un plásmido; cósmido; bacteriófago; o virus que transporta ADN 25 exógeno a una célula. Un vector también puede incluir uno o más genes, que incluyen los que producen moléculas antisentido, y/o genes marcadores de selección y otros elementos

genéticos que se conocen en la técnica. Un vector puede transducir, transformar, o infectar una célula, lo que causa de este modo que la célula exprese las moléculas de ácidos nucleicos y/o proteínas codificadas por el vector. Un vector incluye opcionalmente materiales que ayudan a lograr la entrada de la molécula de ácido nucleico a la célula (por ejemplo, un liposoma, recubrimiento de proteína, etc.).

Rendimiento: Un rendimiento estabilizado de aproximadamente 100 % o más con relación al rendimiento de variedades testigo en la misma ubicación del cultivo que crecen al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones. En modalidades particulares, “rendimiento mejorado” o “mejoramiento del rendimiento” quiere decir una variedad de cultivo que tiene un rendimiento estabilizado de 105 % o más con relación al rendimiento de las variedades testigo en la misma ubicación del cultivo que contiene densidades significativas de las plagas de coleópteros y/o hemípteros que son dañinas para dicho cultivo que crece al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones, dichas plagas son el objetivo de las composiciones y métodos de la presente invención.

A menos que se indique o denote específicamente, los términos “un”, “una”, y “el/la” significan “al menos uno/una”, tal como se usa en la presente invención.

A menos que se explique específicamente de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente invención tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la técnica a la cual pertenece esta descripción. Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse, 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 1-56081-569-8). Todos los porcentajes se expresan en peso y todas las proporciones de las mezclas de solventes se expresan en volumen a menos que se indique de otro modo. Todas las temperaturas se expresan en grados Celsius.

IV. Moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de plaga de insectos

A. Descripción general

5 En la presente invención se describen moléculas de ácidos nucleicos útiles para el control de plagas de insectos. En algunos ejemplos, la plaga de insectos es una plaga de insectos coleópteros (por ejemplo, especies del género *Diabrotica*) o hemípteros (por ejemplo, especies del género *Euschistus*). Las moléculas de ácidos nucleicos descritas incluyen polinucleótidos objetivo (por ejemplo, genes nativos, y polinucleótidos no codificantes), ARNdh, ARNip, ARNhp, 10 ARNh, y miARN. Por ejemplo, en algunas modalidades se describen moléculas de ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y/o ARNh que pueden ser específicamente complementarias a la totalidad o parte de uno o más ácidos nucleicos nativos en una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En estas y otras modalidades adicionales, los ácidos nucleicos nativos pueden ser uno o más genes objetivo, cuyo producto puede, por ejemplo y sin limitación: participar en el 15 desarrollo de larvas/ninfas. Las moléculas de ácidos nucleicos descritas en la presente invención, cuando se introducen a una célula que comprende al menos un ácido nucleico nativo al cual las moléculas de ácidos nucleicos son específicamente complementarias, pueden iniciar la iARN en la célula, y por consiguiente reducir o eliminar la expresión del uno o más ácidos nucleicos nativos. En algunos ejemplos, la reducción o eliminación de la expresión de un gen 20 objetivo por una molécula de ácido nucleico específicamente complementaria a este puede resultar en la reducción o cese del crecimiento, el desarrollo, la viabilidad, y/o la alimentación de la plaga.

En algunas modalidades puede seleccionarse al menos un gen objetivo en una plaga de insectos, en donde el gen objetivo comprende un polinucleótido *spt5*. En algunos ejemplos, se 25 selecciona un gen objetivo en una plaga de coleópteros, en donde el gen objetivo comprende un polinucleótido seleccionado entre las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 85, 87, 101,

103, y 104. En ejemplos particulares, se selecciona un gen objetivo en una plaga de coleópteros del género *Diabrotica*, en donde el gen objetivo comprende un polinucleótido seleccionado entre las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, y 104. En ejemplos particulares, se selecciona un gen objetivo en una plaga de hemípteros, en donde el gen objetivo comprende un polinucleótido
5 seleccionado entre las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85 y 87. En ejemplos particulares, se selecciona un gen objetivo en una plaga de coleópteros del género *Meligethes*, en donde el gen objetivo comprende un polinucleótido seleccionado entre las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101 y 103.

En algunas modalidades, un gen objetivo puede ser una molécula de ácido nucleico que
10 comprende un polinucleótido que puede traducirse de manera inversa *in silico* a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contiguos que es al menos aproximadamente 85 % idéntica (por ejemplo, al menos 84 %, 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 100 %, o 100 % idéntica) a la secuencia de
15 aminoácidos de una proteína producida a partir de un polinucleótido de *spt5*. Un gen objetivo puede ser cualquier polinucleótido de *spt5* en una plaga de insectos, cuya inhibición postranscripcional tiene un efecto nocivo en el crecimiento, la supervivencia, y/o la viabilidad de la plaga, por ejemplo, para proporcionar un beneficio protector a una planta contra la plaga. En ejemplos particulares, un gen objetivo es una molécula de ácido nucleico que comprende un
20 polinucleótido que puede traducirse de manera inversa *in silico* a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contiguos 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
25 aminoácidos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:86; o la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:102.

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

En algunas modalidades, los polinucleótidos objetivo incluyen ARN no codificantes transcritos, tales como 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 otro ARN no codificante transcrito de genes de plaga de insectos objetivo. Dichos polinucleótidos pueden derivarse tanto de genes monocistrónicos como policistrónicos.

Por consiguiente, también se describen en la presente invención junto con algunas modalidades moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNd_h, ARNi_p, miARN, ARNh_p, y ARNh) 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 a la totalidad o parte de una pluralidad de ácidos nucleicos objetivo; por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más ácidos nucleicos objetivo. En modalidades particulares, una molécula de ARNi puede producirse *in vitro*, o *in vivo* por un organismo genéticamente modificado, tal como una planta o una bacteria. También se describen ADN_c que pueden usarse para la producción de moléculas de ARNd_h, moléculas de ARNi_p, moléculas de miARN, moléculas de ARNh_p, y/o moléculas de ARNh que son específicamente complementarias a la totalidad o parte de un ácido nucleico objetivo en una plaga de insectos. Además se describen

constructos de ADN recombinante para su uso en el logro de la transformación estable de huéspedes objetivo particulares. Los huéspedes objetivo transformados pueden expresar niveles efectivos de moléculas de ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y/o ARNh a partir de los 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, en donde la expresión del polinucleótido resulta en una molécula de ARN que comprende una cadena de nucleobases contiguas que es específicamente complementaria a la totalidad o parte de un ácido nucleico objetivo en una plaga de insectos.

En ejemplos particulares, las moléculas de ácidos nucleicos útiles para el control de una plaga de insectos coleópteros o hemípteros pueden incluir: la totalidad o parte de un ácido nucleico nativo aislado de un organismo *Diabrotica* que comprende un polinucleótido de *spt5* (por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, y 104); la totalidad o parte de un ácido nucleico nativo aislado de un organismo hemíptero que comprende un polinucleótido de *spt5* (por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85 y 87); la totalidad o parte de un ácido nucleico nativo aislado de un organismo *Meligethes* que comprende un polinucleótido de *spt5* (por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101 y 103); ADN que cuando se expresan resultan en una molécula de ARN que comprende un polinucleótido que es específicamente complementario a la totalidad o parte de una molécula de ARN nativa codificada por *spt5*; moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNh) que comprenden al menos un polinucleótido que es específicamente complementario a la totalidad o parte de *spt5*; ADNc que pueden usarse para la producción de moléculas de ARNdh, moléculas de ARNip, moléculas de miARN, moléculas de ARNhp, y/o moléculas de ARNh que son específicamente complementarias a la totalidad o parte de *spt5*; y constructos de ADN recombinante para su uso en el logro de la transformación estable de

huéspedes objetivo particulares, en donde un huésped objetivo transformado comprende una o más de las moléculas de ácidos nucleicos antes mencionadas.

B. Moléculas de ácidos nucleicos

La presente invención proporciona, *inter alia*, moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdih, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNh) que inhiben la expresión del gen objetivo en una célula, tejido, u órgano de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros); y moléculas de ADN capaces de expresarse como una molécula de ARNi en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen objetivo en una célula, tejido, u órgano de una plaga de insectos.

Algunas modalidades de la invención proporcionan una molécula de ácido nucleico aislada que

comprende al menos un (por ejemplo, uno, dos, tres, o más) polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, y 101; el complemento de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, o 101; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, o 101 (por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8, 103, y 104; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, o 101; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8 y 104; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8 y 104; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8 y 104; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8 y 104; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; un fragmento de al menos 15 nucleótidos

contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103.

- 5 Algunas modalidades de la invención proporcionan una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos un (por ejemplo, uno, dos, tres, o más) polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85 (por ejemplo, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87); el complemento de un
- 10 fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:97; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo
- 15 hemíptero que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87.

En modalidades particulares, el contacto con o la captación por parte de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) de un ARNi transcrito a partir del polinucleótido

20 aislado inhibe el crecimiento, el desarrollo, y/o la alimentación de la plaga. En algunas modalidades, el contacto con o la captación por el insecto se produce por medio de la alimentación con el material vegetal que comprende el ARNi. En algunas modalidades, el contacto con o la captación por el insecto se produce por medio de la aspersión de una planta que comprende el insecto con una composición que comprende el ARNi.

- 25 En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención puede comprender al menos un (por ejemplo, uno, dos, tres, o más) polinucleótido seleccionado del

grupo que consiste en: la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:94; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:94; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:95; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:96; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:96; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:97; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:97; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:98; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:98; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:100; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:100; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:108; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93-100 y 106-108; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93-100 y 106-108; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93-98 y 108; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93-98 y 108; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93-98 y 108; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:93-98 y 108; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106 o la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106 o la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:107; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE

IDENT.:106-107; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106-107; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106-107; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:106-107; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Euschistus* que comprende cualquiera de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99 y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:100; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Euschistus* que comprende cualquiera de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99 y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:100; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Euschistus* que comprende cualquiera de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99 y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:100; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Euschistus* que comprende cualquiera de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:99 y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:100.

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

En ciertas modalidades, las moléculas de ARNdh proporcionadas por la invención comprenden polinucleótidos complementarios a un transcrito de un gen objetivo que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 85, y 101, y fragmentos de estas, y la inhibición de

dicho gen objetivo en una plaga de insectos resulta en la reducción o eliminación de un agente polipéptido o polinucleótido que es esencial para el crecimiento, el desarrollo, u otra función biológica de la plaga. Un polinucleótido seleccionado puede exhibir de aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 % de identidad de secuencias respecto a cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 85, y 101; un fragmento contiguo de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 85, y 101; y el complemento de cualquiera de las anteriores. Por ejemplo, un polinucleótido seleccionado puede exhibir 79 %; 80 %; aproximadamente 81 %; aproximadamente 82 %; aproximadamente 83 %; aproximadamente 84 %; aproximadamente 85 %; aproximadamente 86 %; aproximadamente 87 %; aproximadamente 88 %; aproximadamente 89 %; aproximadamente 90 %; aproximadamente 91 %; aproximadamente 92 %; aproximadamente 93 %; aproximadamente 94 % aproximadamente 95 %; aproximadamente 96 %; aproximadamente 97 %; aproximadamente 98 %; aproximadamente 98.5 %; aproximadamente 99 %; aproximadamente 99.5 % o aproximadamente 100 % de identidad de secuencias respecto a las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 85, y 101; un fragmento contiguo de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 85, y 101 (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8, 87, 103, y 104); y el complemento de cualquiera de las anteriores.

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

En otras modalidades, una molécula de ácido nucleico puede comprender un primer y un segundo polinucleótidos 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 el primer y segundo polinucleótidos, donde se desee. En una modalidad, el espaciador es parte de un polinucleótido codificante sentido o antisentido para el ARNm. El espaciador puede comprender de manera alternativa cualquier combinación de nucleótidos u homólogos de estos capaces de unirse en forma covalente a una molécula de ácido nucleico.

- 5 En algunos ejemplos, el espaciador puede ser un bucle o un intrón (por ejemplo, el intrón ST-LS1).

Por ejemplo, en algunas modalidades, la molécula de ADN puede comprender un polinucleótido que codifica una o más moléculas de ARNi diferentes, en donde cada una de las moléculas de ARNi diferentes comprende un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, en donde el

- 10 primer y segundo polinucleótidos son complementarios entre sí. El primer y segundo polinucleótidos pueden conectarse dentro de una molécula de ARN por medio de un espaciador. El espaciador puede formar parte del primer polinucleótido o el segundo polinucleótido. La expresión de una molécula de ARN que comprende el primer y segundo polinucleótidos puede conducir a la formación de una molécula de ARNdh, mediante el
- 15 apareamiento intramolecular específico de las bases del primer y segundo polinucleótidos. El primer polinucleótido o el segundo polinucleótido puede ser sustancialmente idéntico a un polinucleótido nativo (por ejemplo, un gen objetivo, o polinucleótido no codificante transcrito) para una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de coleópteros o hemípteros), un derivado de este, o un polinucleótido complementario de este.

- 20 Las moléculas de ácidos nucleicos de ARNdh comprenden hebras dobles de ribonucleótidos polimerizados, y pueden incluir modificaciones ya sea a la estructura principal de azúcares y fosfato o al nucleósido. Las modificaciones en la estructura del ARN pueden adecuarse para permitir la inhibición específica. En una modalidad, las moléculas de ARNdh pueden modificarse a través de un proceso enzimático ubicuo de manera que pueden generarse moléculas de
- 25 ARNip. Este proceso enzimático puede utilizar una enzima RNasa III, tal como 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. DICER o las enzimas RNAsa III funcionalmente equivalentes escinden hebras de ARNdH y/o moléculas de ARNh más grandes en oligonucleótidos más pequeños (por ejemplo, ARNip), cada uno de los cuales tiene de aproximadamente 19-25 nucleótidos de longitud. Las moléculas de ARNip producidas por estas enzimas tienen de 2 a 3 nucleótidos protuberantes 3', y terminales 5' fosfato y 3' hidroxilo. Las moléculas de ARNip generadas por las enzimas RNAsa III se desenrollan y se separan para formar ARN de una hebra en la célula. Después, las moléculas de ARNip se hibridan específicamente con los ARN transcritos a partir de un gen objetivo, y ambas moléculas de ARN se degradan posteriormente por medio de un mecanismo de degradación de ARN celular inherente. Este proceso puede resultar en la degradación o eliminación efectiva 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 las enzimas RNAsa III endógenas a partir de moléculas de ácidos nucleicos heterólogas pueden mediar de manera eficiente la regulación negativa de genes objetivo en plagas de insectos.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico puede incluir al menos un polinucleótido que no se produce naturalmente que puede transcribirse a una molécula de ARN de una hebra capaz de formar una molécula de ARNdH *in vivo* a través de la hibridación intermolecular. Dichos ARNdH por lo general 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 adicionales, 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 dicha molécula de ácido nucleico se proporciona como una molécula de ARNdH a, por ejemplo, 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 ácidos nucleicos

Puede usarse una variedad de polinucleótidos en las plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) como objetivos para el diseño de moléculas de ácidos nucleicos, tales como ARNi y moléculas de ADN que codifican ARNi. Sin embargo, la selección de polinucleótidos nativos no es un proceso sencillo. 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 particular puede regularse negativamente con efectividad por las moléculas de ácidos nucleicos de la invención, o si la regulación negativa de un polinucleótido nativo particular tendrá un efecto perjudicial sobre el crecimiento, la viabilidad, la alimentación, y/o la supervivencia de una plaga de insectos. La amplia mayoría de los polinucleótidos nativos de plagas de coleópteros y hemípteros, tales como EST aisladas de estos (por ejemplo, los polinucleótidos de plagas de coleópteros que se relacionan en la Patente de EE.UU. 7,612,194), no tienen un efecto perjudicial en el crecimiento y/o la viabilidad de la plaga. Tampoco puede predecirse cuáles de los polinucleótidos nativos que pueden tener un efecto perjudicial en una plaga de insectos pueden usarse en técnicas recombinantes para la expresión de moléculas de ácidos nucleicos complementarias a dichos polinucleótidos nativos en una planta huésped y proporcionar el efecto perjudicial en la plaga tras la alimentación sin causar daño a la planta huésped.

En algunas modalidades, las moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ARNdh que se proporcionarán en la planta huésped de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros o hemípteros)) se seleccionan para dirigir las a los ADNc que codifican proteínas o partes de proteínas esenciales para el desarrollo de la plaga, tales como los polipéptidos que participan en rutas bioquímicas metabólicas o catabólicas, la división celular, el metabolismo energético, la digestión, el reconocimiento de la planta huésped, y similares. Tal como se describe en la

presente invención, la ingestión de composiciones por parte de un organismo plaga objetivo que contienen uno o más ARNdh, al menos un segmento del cual es específicamente complementario al menos a un segmento sustancialmente idéntico de ARN producido en las células del organismo plaga objetivo, puede resultar en la muerte u otra inhibición del objetivo.

- 5 Un polinucleótido, ya sea ADN o ARN, derivado de una plaga de insectos puede usarse para construir células vegetales protegidas contra la infestación por las plagas. La planta huésped de la plaga de coleópteros y/o hemípteros (por ejemplo, *Z. mays*, *B. napus*, o *G. max*), por ejemplo, puede transformarse de manera que contenga uno o más polinucleótidos derivados de la plaga de coleópteros y/o hemípteros tal como se proporciona en la presente invención. El
- 10 polinucleótido transformado en el huésped puede codificar uno o más ARN que forman una estructura de ARNdh en las células o los fluidos biológicos dentro del huésped transformado, para de este modo hacer disponible el ARNdh si/cuando la plaga forma una relación nutricional con el huésped transgénico. Esto 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
- 15 desarrollo.

En modalidades particulares, se selecciona como objetivo un gen que participa esencialmente en el crecimiento y desarrollo de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros o hemípteros). Otros genes objetivo para su uso en la presente invención pueden incluir, por ejemplo, aquellos que desempeñan funciones importantes en la viabilidad, el movimiento, la migración, el

20 crecimiento, el desarrollo, la infectividad, y el establecimiento de los sitios de alimentación de la plaga. Por lo tanto, un gen objetivo puede ser un gen constitutivo o un factor de transcripción. Adicionalmente, un polinucleótido nativo de una plaga de insectos para su uso en la presente invención también puede derivarse de un homólogo (por ejemplo, un ortólogo), de un gen vegetal, viral, bacteriano o de insecto, cuya función es conocida por los expertos en la técnica, y

25 cuyo polinucleótido es específicamente hibridable con un gen objetivo en el genoma de la plaga

objetivo. Los métodos para identificar un homólogo de un gen con una secuencia de nucleótidos conocida mediante hibridación son conocidos por los expertos en la técnica.

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

En modalidades adicionales, un método para la obtención de un fragmento de ácido nucleico que comprende un polinucleótido para producir una porción sustancial de una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNh) incluye: (a) sintetizar un primer y segundo oligonucleótidos cebadores específicamente complementarios a una porción de un polinucleótido nativo de una plaga de insectos objetivo (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros); y (b) amplificar un inserto de ADNc o ADNg presente en un vector de clonación con el uso del primer y segundo oligonucleótidos cebadores de la etapa a), en donde la molécula de ácido nucleico amplificada comprende una porción sustancial de una molécula de ARNip, miARN, ARNh, ARNm, ARNhp, o ARNdh.

Los ácidos nucleicos pueden aislarse, amplificarse, o producirse por medio de una serie de enfoques. Por ejemplo, una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNh) puede obtenerse mediante la amplificación por PCR de un polinucleótido objetivo (por ejemplo, un gen objetivo o un polinucleótido no codificante transcrito objetivo) derivado de una biblioteca ADNg o ADNc, o porciones de estos. El ADN o ARN pueden extraerse de un organismo objetivo, y pueden prepararse bibliotecas de ácidos nucleicos de estos con el uso de los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las bibliotecas de ADNg o ADNc generadas a partir de un organismo objetivo pueden usarse para la amplificación por PCR y la secuenciación de los genes objetivo. Un producto de PCR confirmado puede usarse como plantilla para la transcripción *in vitro* para generar ARN sentido y antisentido con promotores mínimos. De manera alternativa, las moléculas de ácidos nucleicos pueden sintetizarse por medio de cualquiera de una serie de técnicas (Ver, por ejemplo, Ozaki *et al.* (1992) Nucleic Acids Research, 20: 5205-5214; y Agrawal *et al.* (1990) Nucleic Acids Research, 18: 5419-5423), que incluyen el uso de un sintetizador de ADN automatizado (por ejemplo, un Sintetizador de ADN/ARN modelo 392 o 394, P.E. Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.), con el uso de químicas estándares, tales como la química de la fosforamidita. Ver, por ejemplo, Beaucage *et al.* (1992) Tetrahedron, 48: 2223-2311; las Patentes de EE.UU. 4,980,460, 4,725,677, 4,415,732, 4,458,066 y 4,973,679. También pueden usarse químicas alternativas que resultan en grupos de estructura principal no naturales, tales como fosforotioato, fosforomidato, y similares.

Una molécula de ARN, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, o ARNh de la presente invención puede producirse químicamente o enzimáticamente por un experto en la técnica a través de reacciones manuales o automatizadas, o *in vivo* en una célula que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica la molécula de ARN, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, o ARNh. El ARN también puede producirse mediante síntesis orgánica parcial o total- cualquier ribonucleótido modificado puede introducirse mediante síntesis

orgánica o enzimática *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

5 Publicación Internacional PCT núm. WO97/32016; y las Patentes de EE.UU. 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 a una célula. Por ejemplo, las moléculas de ARN pueden purificarse a partir de una mezcla mediante extracción con un solvente o una resina, precipitación, electroforesis,

10 cromatografía, o una combinación de estas. De manera alternativa, las moléculas de ARN que se sintetizan químicamente o mediante síntesis enzimática *in vitro* pueden usarse sin o con un mínimo de purificación, por ejemplo, para evitar pérdidas debido al procesamiento de las muestras. Las moléculas de ARN pueden secarse para su almacenamiento o disolverse en una solución acuosa. La solución puede contener tampones o sales para promover el apareamiento,

15 y/o estabilización de las hebras bicatenarias de la molécula de ARNdh.

En las modalidades, una molécula de ARNdh puede formarse por una única hebra de ARN autocomplementaria o a partir de dos hebras de ARN complementarias. Las moléculas de ARNdh pueden sintetizarse ya sea *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 puede usarse ARN

20 polimerasa clonada para mediar la transcripción *in vivo* o *in vitro*. La inhibición postranscripcional de un gen objetivo en una plaga de insectos puede ser dirigida por el huésped mediante la transcripción específica en un órgano, tejido, o tipo celular del huésped (por ejemplo, mediante el uso de un promotor específico del tejido); la estimulación de una condición ambiental en el huésped (por ejemplo, mediante el uso de un promotor inducible que

25 reacciona a la infección, el estrés, la temperatura, y/o inductores químicos); y/o la manipulación genética de la transcripción en una etapa del desarrollo o edad del huésped (por ejemplo,

mediante el uso de un promotor específico de la etapa del desarrollo). Las hebras de ARN que forman una molécula de ARNdh, ya sean transcritas *in vitro* o *in vivo*, pueden ser o no poliadeniladas, y pueden ser o no capaces de traducirse a un polipéptido por medio del aparato de traducción de una célula.

5 D. Vectores recombinantes y transformación de células huésped

En algunas modalidades, la invención también proporciona una molécula de ADN para su introducción a una célula (por ejemplo, una célula bacteriana, una célula de levadura, o una célula vegetal), en donde la molécula de ADN comprende un polinucleótido que, tras su expresión a ARN y su ingestión por parte de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), logra la supresión de un gen objetivo en una célula, tejido, u órgano de la plaga. Por consiguiente, algunas modalidades proporcionan una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un polinucleótido capaz de expresarse como una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNh) en una célula vegetal para inhibir la expresión del gen objetivo en una plaga de insectos. Para iniciar o mejorar la expresión, dichas moléculas de ácidos nucleicos recombinantes pueden comprender uno o más elementos reguladores, cuyos elementos reguladores pueden unirse operativamente al polinucleótido capaz de expresarse como un ARNi. Los métodos para expresar una molécula de supresión génica en plantas son conocidos, y pueden usarse para expresar un polinucleótido de la presente invención. Ver, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT núm. WO06/073727; y la Publicación de Patente de EE.UU. núm. 2006/0200878 AI).

En modalidades específicas, una molécula de ADN recombinante de la invención puede comprender un polinucleótido que codifica un ARN que puede formar una molécula de ARNdh. Dichas moléculas de ADN recombinante pueden codificar ARN que pueden formar moléculas de ARNdh capaces de inhibir la expresión del gen o genes objetivo endógenos en una célula de la plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) luego de su ingestión. En muchas modalidades, un ARN transcrito puede formar una molécula de ARNdh que puede

proporcionarse en una forma estabilizada; por ejemplo, como una estructura de horquilla y de tallo y bucle.

En algunas modalidades, una hebra de una molécula de ARNd_h puede formarse mediante la transcripción de un polinucleótido que es sustancialmente homólogo a un polinucleótido
5 seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 85, y 101; los complementos de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 85, y 101; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 85, y 101 (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8, 87, 103, y 104); el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3,
10 85, y 101; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8 y 104; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8 y 104; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera
15 de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8 y 104; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8 y 104; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo
20 *Meligethes* que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; un polinucleótido codificante nativo de un
25 organismo hemíptero (por ejemplo, BSB) que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que

comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende la

5 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87.

En algunas modalidades, una hebra de una molécula de ARNdh puede formarse por transcripción de un polinucleótido que es sustancialmente homólogo a un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8, 87, 103, y 104; el complemento de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8, 87, 103, y 104; fragmentos

10 de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 85, y 101; y los complementos de fragmentos de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 85, y 101.

En modalidades particulares, una molécula de ADN recombinante que codifica un ARN que puede formar una molécula de ARNdh puede comprender una región codificante en donde al

15 menos dos polinucleótidos se disponen de manera que un polinucleótido está en una orientación sentido, y el otro polinucleótido está en una orientación antisentido, con relación al menos a un promotor, en donde el polinucleótido sentido y el polinucleótido antisentido se unen o conectan por un espaciador, por ejemplo, de aproximadamente cinco (~5) a aproximadamente mil (~1000) nucleótidos. El espaciador puede formar un bucle entre los polinucleótidos sentido y

20 antisentido. El polinucleótido sentido o el polinucleótido antisentido pueden ser sustancialmente homólogos a un gen objetivo (por ejemplo, un gen *spt5* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 85, 87, 101, 103, y 104) o fragmento de este. En algunas modalidades, sin embargo, una molécula de ADN recombinante puede codificar un ARN que puede formar una molécula de ARNdh sin un espaciador. En las modalidades, un polinucleótido

25 codificante sentido y un polinucleótido codificante antisentido pueden ser de longitudes diferentes.

Los polinucleótidos identificados como causantes de un efecto nocivo en una plaga de insectos o un efecto protector para las plantas con relación a la plaga pueden incorporarse fácilmente a moléculas de ARNdh expresadas a través de la creación de casetes de expresión apropiados en una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención. Por ejemplo, dichos

5 polinucleótidos pueden expresarse como una horquilla con estructura de tallo y bucle al tomar un primer segmento correspondiente a un polinucleótido del gen objetivo (por ejemplo, un gen *spt5* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 85, 87, 101, 103, y 104, y fragmentos de cualquiera de las anteriores); unir este polinucleótido a un segundo segmento de región espaciadora que no es homólogo o complementario al primer segmento; y

10 unir este a un tercer segmento, en donde al menos una porción del tercer segmento es sustancialmente complementaria al primer segmento. Dicho constructo forma una estructura de tallo y bucle mediante el apareamiento intramolecular de bases del primer segmento con el tercer segmento, en donde se forma la estructura de bucle que comprende el segundo segmento. Ver, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes de EE.UU. núm. 2002/0048814 y

15 2003/0018993; y las Publicaciones Internacionales PCT núm. WO94/01550 y WO98/05770. Una molécula de ARNdh puede generarse, por ejemplo, en forma de una estructura de doble hebra tal como una estructura de tallo y bucle (por ejemplo, horquilla), por medio de la cual la producción del ARNip dirigido a un polinucleótido nativo de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) se mejora por medio de la coexpresión de un fragmento del gen

20 objetivo, por ejemplo, en un casete de expresión en plantas adicional, que conduce a una mayor producción de ARNip, o reduce la metilación para prevenir el silenciamiento génico transcripcional del promotor de la horquilla de ARNdh.

Ciertas modalidades de la invención incluyen la introducción de una molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención a una planta (es decir, transformación) para lograr

25 niveles de expresión de una o más moléculas de ARNi que inhiben la plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Una molécula de ADN recombinante puede ser, por

ejemplo, un vector, tal como un plásmido lineal o circular cerrado. El sistema de vectores puede ser un único vector o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se introducirá en el genoma de un huésped. Además, un vector puede ser un vector de expresión. Los ácidos nucleicos de la invención pueden, por ejemplo, insertarse de manera adecuada en un vector bajo el control de un promotor adecuado que funciona en uno o más huéspedes para activar la expresión de un polinucleótido codificante unido u otro elemento de ADN. Muchos vectores están disponibles para este propósito, y la selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño del ácido nucleico que se insertará en el vector y la célula huésped particular que se transformará con el vector. Cada vector contiene varios componentes en dependencia de su función (por ejemplo, amplificación del ADN o expresión del ADN) y la célula huésped particular con la cual es compatible.

Para impartir protección a una planta transgénica contra una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), un ADN recombinante puede, por ejemplo, transcribirse a una molécula de ARNi (por ejemplo, una molécula de ARN que forma una molécula de ARNdh) dentro de los tejidos o los 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 causar daños a las especies vegetales huéspedes. La plaga puede ponerse en contacto con la molécula de ARNi que se transcribe en células de la planta huésped transgénica, por ejemplo, mediante la ingestión de células o fluidos de la planta huésped transgénica que comprende la molécula de ARNi. Por consiguiente, en ejemplos particulares, la expresión de un gen objetivo se suprime por la molécula de ARNi dentro de las plagas de coleópteros y/o hemípteros que infestan 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.

Para posibilitar la administración de las moléculas de ARNi a una plaga de insectos en una relación nutricional con una célula vegetal que se ha transformado 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. Por consiguiente, una molécula de ácido nucleico recombinante puede comprender un polinucleótido de la invención unido operativamente a uno o más elementos reguladores, tales como un elemento promotor heterólogo que funciona en una célula huésped, tal como una célula bacteriana en donde la molécula de ácido nucleico se amplificará, y una célula vegetal en donde la molécula de ácido nucleico se expresará.

Los promotores adecuados para su uso en las moléculas de ácidos nucleicos de la invención incluyen aquellos que son inducibles, virales, sintéticos, o constitutivos, todos los cuales son muy conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes que describen dichos promotores incluyen las Patentes de EE.UU. 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 de CaMV); 6,433,252 (promotor de la oleosina L3 de maíz); 6,429,357 (promotor de la actina 2 del arroz, e intrón de la actina 2 del arroz); 6,294,714 (promotores inducibles por la luz); 6,140,078 (promotores inducibles por sales); 6,252,138 (promotores inducibles por patógenos); 6,175,060 (promotores inducibles por deficiencia de fósforo); 6,388,170 (promotores bidireccionales); 6,635,806 (promotor de la gamma coixina); y la Publicación de Patente de EE.UU. núm. 2009/757,089 (promotor de la aldolasa de cloroplastos del maíz). Los promotores adicionales incluyen el promotor de la nopalina sintasa (NOS) (Ebert *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84(16):5745-9) y los promotores de la octopina sintasa (OCS) (que se hallan en plásmidos inductores de tumor de *Agrobacterium tumefaciens*); los promotores de 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 de la 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 1:1175-83); el promotor del gen de la proteína de unión a la clorofila a/b; 35S de CaMV (Patentes de EE.UU. 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142 y 5,530,196); 35S de FMV (Patentes de EE.UU. 6,051,753 y 5,378,619); un promotor PC1SV (Patente de EE.UU. 5,850,019); el promotor SCP1 (Patente de EE.UU. 6,677,503); y promotores AGR_{tu.nos} (núm. de acceso de 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 ácidos nucleicos de la invención comprenden un promotor específico del tejido, tal como un promotor específico de la raíz. Los promotores específicos de la raíz activan la expresión de polinucleótidos codificantes unidos operativamente, exclusivamente o preferentemente, en el tejido radicular. Los ejemplos de promotores específicos de la raíz son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 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 transcripcionales opuestas con relación al polinucleótido o fragmento, y que son operativos en una célula vegetal transgénica y se expresan en esta para producir moléculas de ARN en la célula vegetal transgénica que posteriormente pueden formar moléculas de ARN^{dh}, tal como se describió, *supra*. Las moléculas de ARNⁱ expresadas en los tejidos vegetales pueden ingerirse por una plaga de insectos de manera que se logra la supresión de la expresión del gen objetivo.

Los elementos reguladores adicionales que opcionalmente pueden unirse operativamente a un ácido nucleico incluyen 5'UTR ubicadas entre un elemento promotor y un polinucleótido codificante que funciona como un elemento líder de traducción. El elemento líder de traducción está 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 traducción incluyen los líderes de proteínas de choque térmico de maíz y petunia (Patente de EE.UU. 5,362,865), líderes de proteínas de cubierta 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
5 limitantes de 5'UTR incluyen GmHsp (Patente de EE.UU. 5,659,122); PhDnaK (Patente de EE.UU. 5,362,865); AtAnt1; TEV (Carrington y Freed (1990) *J. Virol.* 64:1590-7); y AGRtunos (núm. de acceso de GenBank™ V00087; y Bevan *et al.* (1983) *Nature* 304:184-7).

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

Algunas modalidades pueden incluir un vector de transformación de plantas que comprende una molécula de ADN aislada y purificada que comprende al menos uno de los elementos reguladores descritos anteriormente unido operativamente a uno o más polinucleótidos de la
25 presente invención. Cuando se expresan, el uno o más polinucleótidos resultan en una o más moléculas de ARNi que comprenden un polinucleótido que es específicamente complementario

a la totalidad o parte de una molécula de ARN nativa en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros). Por consiguiente, el uno o más polinucleótidos pueden comprender un segmento que codifica la totalidad o parte de un polirribonucleótido presente dentro de un transcrito de ARN objetivo de una plaga de coleópteros y/o hemípteros, y pueden

5 comprender repeticiones invertidas de la totalidad o parte de un transcrito objetivo de la plaga. Un vector de transformación de plantas puede contener polinucleótidos específicamente complementarios a más de un polinucleótido objetivo, 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

10 polinucleótidos específicamente complementarios a los polinucleótidos presentes en diferentes genes pueden combinarse en una única molécula de ácido nucleico compuesta para su expresión en una planta transgénica. Tales segmentos pueden ser contiguos o separados por un espaciador.

En otras modalidades, un plásmido de la presente invención que ya contiene al menos un

15 polinucleótido de la invención puede modificarse mediante la inserción secuencial de polinucleótidos adicionales en el mismo plásmido, en donde los polinucleótidos adicionales están unidos operativamente a los mismos elementos reguladores que el al menos un polinucleótido original. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico puede diseñarse para la inhibición de múltiples genes objetivo. En algunas modalidades, los múltiples

20 genes que se inhibirán pueden obtenerse a partir de la misma especie de plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros o hemípteros), lo que puede mejorar la efectividad de la molécula de ácido nucleico. En otras modalidades, los genes pueden derivarse de diferentes plagas de insectos, lo que puede ampliar el rango de plagas contra las cuales el(los) agente(s) es/son efectivos. Cuando múltiples genes se seleccionan como objetivo para la supresión o una combinación de

25 expresión y supresión, puede diseñarse por ingeniería genética un elemento de ADN policistrónico.

Un vector o molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención puede comprender un marcador de selección que confiere un fenotipo seleccionable en una célula transformada, tal como una célula vegetal. También pueden usarse marcadores de selección para seleccionar plantas o células vegetales que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención. El marcador puede codificar resistencia a biocidas, resistencia a antibióticos (por ejemplo, kanamicina, geneticina (G418), bleomicina, higromicina, *etc.*), o tolerancia a herbicidas (por ejemplo, glifosato, *etc.*). Los ejemplos de marcadores de selección incluyen, pero no se limitan a: un gen *neo* que codifica la resistencia a la kanamicina y puede seleccionarse con el uso de kanamicina, G418, *etc.*; un gen *bar* que codifica la resistencia a bialafos; un gen mutante de EPSP sintasa que codifica la tolerancia al glifosato; un gen *nitrilasa* que confiere resistencia al bromoxinilo; un gen mutante de acetolactato sintasa (*ALS*) que confiere tolerancia a la imidazolinona o sulfonilurea; y un gen *DHFR* de resistencia al metotrexato. Están disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina, espectinomina, rifampicina, estreptomicina y tetraciclina y similares. Los ejemplos de dichos marcadores de selección se ilustran, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. 5,550,318; 5,633,435; 5,780,708 y 6,118,047.

Un vector o molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención también puede incluir un marcador de cribado. Los marcadores de cribado pueden usarse para monitorear la expresión. Los marcadores de cribado ilustrativos incluyen un gen *uidA* (GUS) o de β -glucuronidasa que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos (Jefferson *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405); un gen del locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos vegetales (Dellaporta *et al.* (1988) "Molecular cloning of the maize *R-nj* allele by transposon tagging with *Ac*". En el 18th Stadler Genetics Symposium, P. Gustafson y R. Appels, eds. (Nueva York: Plenum), pp. 263-82); un gen de β -lactamasa (Sutcliffe *et al.* (1978) Proc. Natl. Acad. Sci.

EE.UU. 75:3737-41); un gen que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen de luciferasa (Ow *et al.* (1986) Science 234:856-9); un gen *xyIE* 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 la tirosina a DOPA y dopaquinona que a su vez se condensa con melanina (Katz *et al.* (1983) J. Gen. Microbiol. 129:2703-14); y una α -galactosidasa.

En algunas modalidades, las moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, tal como se describió, *supra*, pueden usarse en los métodos para la creación de plantas transgénicas y la expresión de ácidos nucleicos heterólogos en plantas para preparar plantas transgénicas que exhiben susceptibilidad reducida a las 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 ácidos nucleicos que codifican moléculas de ARNi en vectores de transformación de plantas y su introducción a las plantas.

Los métodos adecuados para la transformación de células huésped incluyen cualquier método por medio del cual el ADN puede introducirse a una célula, tal como mediante transformación de protoplastos (Ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5,508,184), mediante captación de ADN mediada por desecación/inhibición (Ver, por ejemplo, Potrykus *et al.* (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183-8), mediante electroporación (Ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5,384,253), mediante agitación con fibras de carburo de silicio (Ver, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 5,302,523 y 5,464,765), mediante transformación mediada por *Agrobacterium* (Ver, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 5,563,055; 5,591,616; 5,693,512; 5,824,877; 5,981,840 y 6,384,301) y mediante aceleración de partículas recubiertas de ADN (Ver, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 5,015,580; 5,550,318; 5,538,880; 6,160,208; 6,399,861 y 6,403,865), *etc.* Las técnicas que son particularmente útiles para la transformación del maíz se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. 7,060,876 y 5,591,616; y la Publicación Internacional PCT WO95/06722. A

través de la aplicación de técnicas como estas, las células de prácticamente cualquier especie pueden transformarse de manera estable. En algunas modalidades, el ADN transformante se integra en el genoma de la célula huésped. En el caso de especies multicelulares, las células transgénicas pueden regenerarse en un organismo transgénico. Cualquiera de estas técnicas
5 puede usarse para producir una planta transgénica, por ejemplo, que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican una o más moléculas de ARNi en el genoma de la planta transgénica.

El método más ampliamente utilizado para introducir un vector de expresión a las plantas se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium*. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*
10 son bacterias del suelo patógenas de plantas que transforman genéticamente las células vegetales. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. Rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta. Los plásmidos Ti (inductores de tumor) contienen un segmento grande, conocido como ADN-T, que se transfiere a las plantas transformadas. Otro segmento del plásmido Ti, la región Vir, es responsable de la transferencia
15 del ADN-T. La región de ADN-T está limitada por repeticiones terminales. En vectores binarios modificados, los genes inductores de tumor se han eliminado, y las funciones de la región Vir se utilizan para transferir ADN foráneo limitado por los elementos de frontera del ADN-T. La región T también puede contener un marcador de selección para la recuperación eficiente de las células y plantas transgénicas, y un sitio de clonación múltiple para la inserción de
20 polinucleótidos para la transferencia tales como un ácido nucleico que codifica ARNdh.

En modalidades particulares, un vector de transformación de plantas se deriva de un plásmido Ti de *A. tumefaciens* (Ver, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 4,536,475, 4,693,977, 4,886,937 y 5,501,967; y la Patente Europea núm. EP 0 122 791) o un plásmido Ri de *A. rhizogenes*. Los vectores de transformación de plantas adicionales incluyen, por ejemplo y sin
25 limitación, los descritos por Herrera-Estrella *et al.* (1983) Nature 303:209-13; Bevan *et al.* (1983) Nature 304:184-7; Klee *et al.* (1985) Bio/Technol. 3:637-42; y en la Patente Europea núm. EP 0

120 516, y aquellos que se derivan de cualquiera de los anteriores. Otras bacterias tales como *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, y *Mesorhizobium* que interactúan con las plantas naturalmente pueden modificarse para mediar la transferencia de genes a una serie de diversas plantas. Estas bacterias simbióticas asociadas a las plantas pueden hacerse competentes para la
5 transferencia de genes mediante la adquisición tanto de un plásmido Ti desarmado como de un vector binario adecuado.

Después de proporcionar el ADN exógeno a las células receptoras, las células transformadas se identifican generalmente para el cultivo posterior y la regeneración de las plantas. Para mejorar la capacidad para identificar las células transformadas, puede ser conveniente usar un
10 gen marcador de selección o de cribado, tal como se indicó anteriormente, con el vector de transformación usado para generar el transformante. En el caso en que se use un marcador de selección, las células transformadas se identifican dentro de la población de células potencialmente transformadas mediante la exposición de las células a un agente o agentes de selección. En el caso en que se use un marcador de cribado, las células pueden cribarse para
15 detectar el rasgo genético marcador deseado.

Las células que sobreviven a la exposición al agente de selección, o las células que se han calificado como positivas en un análisis de cribado, pueden cultivarse en medios que soportan la regeneración de plantas. En algunas modalidades, cualquiera de los medios de cultivo de tejidos vegetales adecuados (por ejemplo, los medios MS y N6) puede modificarse mediante la
20 inclusión de sustancias adicionales, tales como reguladores del crecimiento. El tejido puede mantenerse en un medio básico con reguladores del crecimiento hasta que haya tejido suficiente para iniciar los esfuerzos de regeneración de plantas, o someterse a rondas repetidas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración (por ejemplo, al menos 2 semanas), después se transfiere a medios que conducen a la formación de
25 brotes. Los cultivos se transfieren periódicamente hasta que se ha producido suficiente formación de brotes. Una vez que se forman los brotes, estos se transfieren a medios que

conducen a la formación de raíces. Una vez que se forman suficientes raíces, las plantas pueden transferirse al suelo para su crecimiento y maduración posteriores.

Para confirmar la presencia de una molécula de ácido nucleico de interés (por ejemplo, un ADN que codifica una o más moléculas de ARNi que inhiben la expresión del gen objetivo en una
5 plaga de coleópteros y/o hemípteros) en las plantas en regeneración, puede realizarse una variedad de ensayos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo: ensayos biológicos moleculares, tales como transferencias de Southern y Northern, PCR, y secuenciación de ácidos nucleicos; ensayos bioquímicos, tales como la detección de la presencia de un producto proteico, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y/o transferencias de Western) o mediante función
10 enzimática; ensayos de partes de plantas, tales como ensayos de hojas o raíces; y análisis del fenotipo de toda la planta regenerada.

Los eventos de integración pueden analizarse, por ejemplo, mediante amplificación por PCR con el uso, por ejemplo, de oligonucleótidos cebadores específicos para una molécula de ácido nucleico de interés. Se entiende que la clasificación genotípica por PCR incluye, pero no se
15 limita a, la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADNg derivado del tejido aislado de callos de la planta huésped que se espera contenga una molécula de ácido nucleico de interés integrada en el genoma, seguido por clonación estándar y análisis de secuencias de los productos de amplificación por PCR. Los métodos de clasificación genotípica por PCR se encuentran bien descritos (por ejemplo, Rios, G. *et al.* (2002) Plant J. 32:243-53) y
20 pueden aplicarse al ADNg derivado de cualquier especie vegetal (por ejemplo, *Z. mays*, *B. napus*, y *G. max*) o tipo de tejido, que incluye cultivos celulares.

Una planta transgénica formada con el uso de métodos de transformación dependientes de *Agrobacterium* contiene por lo general un único ADN recombinante insertado en un cromosoma. El polinucleótido del único ADN recombinante se refiere como un “evento transgénico” o “evento
25 de integración”. Dichas plantas transgénicas son heterocigotas para el polinucleótido exógeno insertado. En algunas modalidades, una planta transgénica homocigota con respecto a un

transgén puede obtenerse por apareamiento sexual (autofertilización) de una planta transgénica segregante independiente que contiene un único gen exógeno consigo misma, por ejemplo, una planta T_0 , para producir semilla T_1 . Una cuarta parte de la semilla T_1 producida será homocigota con respecto al transgén. La germinación de la semilla T_1 resulta en plantas que pueden someterse a prueba para determinar la heterocigosidad, por lo general con el uso de un ensayo de SNP o un ensayo de amplificación térmica que permite la distinción entre heterocigotas y homocigotas (es decir, un ensayo de cigosidad)

En modalidades particulares, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más moléculas de ARNi diferentes se producen en una célula vegetal que tienen 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 a partir de un único ácido nucleico introducido en un único evento de transformación. En algunas modalidades, una pluralidad de moléculas de ARNi se expresan bajo el control de un único promotor. En otras modalidades, una pluralidad de moléculas de ARNi se expresan bajo el control de múltiples promotores. Pueden expresarse moléculas de ARNi individuales que comprenden múltiples polinucleótidos que son cada uno homólogos a loci diferentes dentro de una o más plagas de insectos (por ejemplo, los loci definidos por las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 85, y 101), en poblaciones diferentes de la misma especie de plaga de insectos, o en especies de plagas de insectos diferentes.

Además de la transformación directa de una planta con una molécula de ácido nucleico recombinante, las plantas transgénicas pueden prepararse mediante el cruzamiento de una primera planta que tiene al menos un evento transgénico con una segunda planta que carece de dicho 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 susceptible a la transformación para producir una planta transgénica, dicha planta transgénica puede cruzarse con una segunda línea vegetal para la introgresión del

polinucleótido que codifica las 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 las células vegetales transformadas, en donde las semillas o los productos básicos comprenden una cantidad detectable de un ácido nucleico de la invención. En algunas modalidades, dichos productos básicos pueden producirse, por ejemplo, mediante la obtención de plantas transgénicas y la preparación de alimento o pienso a partir de estas. Los productos básicos que comprenden uno o más de los polinucleótidos de la invención incluyen, por ejemplo y sin limitación: harinas, aceites, granos triturados o enteros o semillas de una planta, y cualquier producto alimenticio que comprende cualquier harina, aceite, o grano triturado o entero de un 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 una o más materias primas o productos básicos es *de facto* una evidencia de que las materias primas o productos básicos se producen a partir de una planta transgénica diseñada para expresar una o más de las moléculas de ARNi de la invención para el propósito de controlar plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros).

En algunas modalidades, una planta o semilla transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención también puede comprender al menos otro evento transgénico en su genoma, que incluye sin limitación: un evento transgénico a partir del cual se transcribe una molécula de ARNi dirigida a un locus en una plaga de coleópteros o hemípteros distinto al definido por la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85, y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101, tal como, por ejemplo, uno o más loci seleccionados del grupo que consiste en *Caf1-180* (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2012/0174258), *VatpaseC* (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2012/0174259), *Rho1* (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2012/0174260), *VatpaseH* (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2012/0198586), *PPI-87B* (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2013/0091600), *RPA70* (Publicación de

Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2013/0091601), *RPS6* (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2013/0097730), *ROP* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 14/577,811), *ARN polimerasa II140* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 14/577,854), *Dre4* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 14/705,807), *ncm* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/095487), *COPI alfa* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/063,199), *COPI beta* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/063,203), *COPI gamma* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/063,192), *COPI delta* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/063,216), *ARN polimerasa II* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/133,214), *ARN polimerasa II-215* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/133,202), *ARN polimerasa 33* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/133,210), y chaperona de histona *spt6* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/168613); un evento transgénico a partir del cual se transcribe una molécula de ARNi dirigida a un gen en un organismo que no pertenece a una plaga de coleópteros y/o hemípteros (por ejemplo, un nemátodo parasitario de plantas); un gen que codifica una proteína insecticida (por ejemplo, una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*, y un polipéptido PIP-1); un gen de tolerancia a herbicidas (por ejemplo, un gen que proporciona tolerancia al glifosato); y un gen que contribuye a un fenotipo deseable en la planta transgénica, tal como mayor rendimiento, metabolismo de los ácidos grasos alterado, o restablecimiento de la esterilidad masculina citoplasmática). En modalidades particulares, los polinucleótidos que codifican las moléculas de ARNi de la invención pueden combinarse con otros rasgos de enfermedades y control de insectos en una planta para lograr los rasgos deseados para el mejor control de las enfermedades de las plantas y el daño causado por los insectos. La combinación de rasgos de control de insectos que usan modos de acción distintos pueden proporcionar plantas transgénicas protegidas con durabilidad superior respecto a las plantas que albergan un único rasgo de control, por ejemplo, debido a la menor probabilidad de que se desarrolle resistencia a los rasgos en el campo.

V. *Supresión del gen objetivo en una plaga de insectos*

A. Descripción general

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

B. Supresión del gen objetivo mediada por la iARN

En ciertas modalidades, la invención proporciona moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, y ARNh) que pueden diseñarse para dirigirlas a polinucleótidos nativos esenciales (por ejemplo, genes esenciales) en el transcriptoma de una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de coleópteros (por ejemplo WCR, NCR, SCR, y PB) o hemípteros (por ejemplo, BSB)), por ejemplo, mediante el diseño de una molécula de ARNi que comprende al menos una hebra que comprende un polinucleótido que es específicamente complementario al

polinucleótido objetivo. La secuencia de una molécula de ARNi así diseñada puede ser idéntica a la del polinucleótido objetivo, o puede incorporar discrepancias que no impiden la hibridación específica entre la molécula de ARNi y su polinucleótido objetivo.

Las moléculas de ARNi de la invención pueden usarse en métodos para la supresión génica en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), para reducir de este modo el nivel o incidencia del daño causado por la plaga en una planta (por ejemplo, una planta transformada protegida que comprende una molécula de ARNi). Tal como se usa en la presente invención, el término “supresión génica” se refiere a cualquiera de los métodos muy conocidos para la reducción de los niveles de proteína producida como resultado de la transcripción génica a ARNm y la posterior traducción del ARNm, que incluyen la reducción de la expresión de la proteína a partir de un gen o un polinucleótido codificante que incluyen la inhibición postranscripcional de la expresión y la supresión transcripcional. La inhibición postranscripcional está 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 usada para la supresión. Adicionalmente, la inhibición postranscripcional se refiere a la reducción sustancial y medible de la cantidad de ARNm disponible en la célula para la unión a ribosomas.

En algunas modalidades en donde una molécula de ARNi es una molécula de ARNdh, la molécula de ARNdh puede escindirse por la enzima, DICER, a moléculas de ARNip cortas (aproximadamente 20 nucleótidos de longitud). La molécula de ARNip de doble hebra generada por la actividad de DICER sobre la molécula de ARNdh puede separarse en dos ARNip de una hebra; la “hebra pasajera” y la “hebra guía”. La hebra pasajera puede degradarse y la hebra guía puede incorporarse a RISC. La inhibición postranscripcional se produce por hibridación específica de la hebra guía con un polinucleótido específicamente complementario de una molécula de ARNm, y posterior escisión por la enzima, Argonauta (componente catalítico del complejo RISC).

En otras modalidades de la invención, puede usarse cualquier forma de molécula de ARNi. Los expertos en la técnica entenderán que las moléculas de ARNd_h por lo general son más estables durante la preparación y durante la etapa de provisión de la molécula de ARNi a una célula que las moléculas de ARN de una hebra, y por lo general también son más estables en una célula.

- 5 Por consiguiente, si bien las moléculas de ARNi_p y miARN, por ejemplo, pueden ser igualmente efectivas en algunas modalidades, una molécula de ARNd_h puede elegirse debido a su estabilidad.

En modalidades particulares, se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido, dicho polinucleótido puede expresarse *in vitro* para producir una molécula de
10 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 ARNd_h estabilizada que comprende una estructura de tallo y bucle. Después que una plaga de insectos se pone en contacto con la molécula de ARNi transcrita *in vitro*, puede
15 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 usa en un método para la inhibición postranscripcional de un gen
20 objetivo en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), en donde el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en: la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6; el
25 complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8; el

complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104; el
complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:104; un fragmento de al menos 15 nucleótidos
contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y 3; el complemento de un
5 fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE
IDENT.:1 y 3; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende
cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8 y 104; el complemento de un polinucleótido
codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON
NÚM. DE IDENT.:5-8 y 104; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un
10 polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las
SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8 y 104; el complemento de un fragmento de al menos 15
nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que
comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8 y 104; la SEC. CON NÚM. DE
IDENT.:101; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101; la SEC. CON NÚM. DE
IDENT.:103; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; un fragmento de al menos
15 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101; el complemento de un
fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101; un
polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEC. CON
NÚM. DE IDENT.:103; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo
Meligethes que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; un fragmento de al menos 15
20 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que
comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; el complemento de un fragmento de al menos
15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes*
que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:103; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; el
complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87; el
25 complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87; un fragmento de al menos 15 nucleótidos
contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; el complemento de un fragmento de al menos

15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85; un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87; un fragmento de al menos 15 nucleótidos

5 contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo hemíptero que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87. En ciertas modalidades, la expresión de una molécula de ácido nucleico que es al menos aproximadamente 80 % idéntica (por ejemplo, 79 %,

10 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

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

20 Una característica importante de algunas modalidades en la presente invención es que el sistema de inhibición postranscripcional por iARN es capaz de tolerar variaciones en las secuencias entre genes objetivo que pueden esperarse debido a la mutación genética, polimorfismos de las cepas, o divergencia evolutiva. No es necesario que la molécula de ácido nucleico introducida sea absolutamente homóloga a un producto de transcripción primario o a

25 un ARNm completamente procesado de un gen objetivo, siempre que la molécula de ácido nucleico introducida sea específicamente hibridable a un producto de transcripción primario o a

un ARNm completamente procesado del gen objetivo. Además, no es necesario que la molécula de ácido nucleico introducida sea de longitud completa, con relación a un producto de transcripción primario o un ARNm completamente procesado del gen objetivo.

La inhibición de un gen objetivo con el uso de la tecnología de ARNi de la presente invención es

5 específica de la secuencia; es decir, los polinucleótidos sustancialmente homólogos a la(s) molécula(s) de ARNi son objetivos para la inhibición genética. En algunas modalidades, una molécula de ARN que comprende un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la de una porción de un gen objetivo puede usarse para la inhibición. En estas y otras modalidades adicionales, puede usarse una molécula de ARN que comprende un polinucleótido

10 con una o más inserciones, eliminaciones, y/o mutaciones puntuales con relación a un polinucleótido objetivo. En modalidades particulares, una molécula de ARNi y una porción de un gen objetivo pueden compartir, por ejemplo, al menos de aproximadamente 80 %, al menos de aproximadamente 81 %, al menos de aproximadamente 82 %, al menos de aproximadamente 83 %, al menos de aproximadamente 84 %, al menos de aproximadamente 85 %, al menos de

15 aproximadamente 86 %, al menos de aproximadamente 87 %, al menos de aproximadamente 88 %, al menos de aproximadamente 89 %, al menos de aproximadamente 90 %, al menos de aproximadamente 91 %, al menos de aproximadamente 92 %, al menos de aproximadamente 93 %, al menos de aproximadamente 94 %, al menos de aproximadamente 95 %, al menos de aproximadamente 96 %, al menos de aproximadamente 97 %, al menos de aproximadamente

20 98 %, al menos de aproximadamente 99 %, al menos de aproximadamente 100 %, y 100 % de identidad de secuencias. De manera alternativa, la región bicatenaria de una molécula de ARNd_h puede ser específicamente hibridable con una porción de un transcrito de gen objetivo. En moléculas específicamente hibridables, un polinucleótido de longitud menor que la longitud completa que exhibe una mayor homología compensa un polinucleótido de mayor longitud,

25 menos homólogo. La longitud del polinucleótido de una región bicatenaria de una molécula de ARNd_h que es idéntica a una porción de un transcrito de gen objetivo puede ser de al menos

aproximadamente 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, o al menos de aproximadamente 1000 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 500-1000 nucleótidos, en dependencia del tamaño del gen objetivo.

En ciertas modalidades, la expresión de un gen objetivo en una plaga de insectos (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. Inhibición significativa se refiere a la inhibición respecto a un umbral que resulta en un fenotipo detectable (por ejemplo, cese del crecimiento, cese de la alimentación, cese del desarrollo, inducción de la mortalidad, *etc.*), o una disminución detectable en el ARN y/o producto génico correspondiente al gen objetivo que se inhibe. Aunque, en ciertas modalidades de la invención, la inhibición se produce sustancialmente en todas las células de la plaga, en otras modalidades la inhibición se produce solamente en un subconjunto de células que expresan el gen objetivo.

En algunas modalidades, la supresión transcripcional está mediada por la presencia en una célula de una molécula de ARNdh que exhibe una identidad de secuencias sustancial con respecto a un ADN promotor o el complemento de este para efectuar lo que se refiere como “transupresión del promotor”. La supresión génica puede ser efectiva contra genes objetivo en una plaga de insectos que pueden ingerir o ponerse en contacto con dichas moléculas de ARNdh, por ejemplo, al ingerir o ponerse en contacto con el material vegetal que contiene las moléculas de ARNdh. Las moléculas de ARNdh para su uso en la transupresión del promotor pueden diseñarse específicamente para inhibir o suprimir la expresión de uno o más polinucleótidos homólogos o complementarios en las células de la plaga de insectos. La supresión génica postranscripcional por ARN con orientación sentido o antisentido para regular

la expresión génica en células vegetales se describe en las Patentes de EE.UU. 5,107,065; 5,759,829; 5,283,184; y 5,231,020.

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

La expresión de moléculas de ARNi para la inhibición génica mediada por la iARN en una plaga
5 de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) puede llevarse a cabo en cualquiera de
muchos formatos *in vitro* o *in vivo*. Las moléculas de ARNi pueden entonces proporcionarse a
una plaga de insectos, por ejemplo, al poner en contacto 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
10 hemípteros, células vegetales transformadas, y progenie de plantas transformadas. Las células
vegetales transformadas y las plantas transformadas pueden manipularse genéticamente para
expresar una o más de las moléculas de ARNi, por ejemplo, bajo el control de un promotor
heterólogo, para proporcionar un efecto protector contra la plaga. Por consiguiente, cuando una
plaga de insectos consume una célula vegetal o planta transgénica durante su alimentación, la
15 plaga puede ingerir las moléculas de ARNi expresadas en las células o plantas transgénicas.
Los polinucleótidos de la presente invención también pueden introducirse en una amplia
variedad de microorganismos procariotas y eucariotas huéspedes para producir las moléculas
de ARNi. El término “microorganismo” incluye especies procariotas y eucariotas, tales como
bacterias y hongos.

20 La modulación de la expresión génica puede incluir la supresión parcial o completa de dicha
expresión. En otra modalidad, un método para la supresión de 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 ARNd_h
formada después de la transcripción de un polinucleótido tal como se describe en la presente
25 invención, de la cual al menos un segmento es complementario a un ARNm dentro de las
células de la plaga de insectos. Una molécula de ARNd_h, que incluye su forma modificada tal

como una molécula de ARNip, miARN, ARNhp, o ARNh, 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 *spt5*, por ejemplo, que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 3, 5-8, 85, 87, 101, 103, y 104. Por lo tanto, se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos aisladas y sustancialmente purificadas que incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos que no se producen naturalmente y constructos de ADN recombinante para proporcionar moléculas de ARNdh, las cuales suprimen o inhiben la expresión de un polinucleótido codificante endógeno o un polinucleótido codificante objetivo en una plaga de insectos cuando se introducen en esta.

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 de plantas (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) y el control de una población de la plaga de plantas. En algunas modalidades, el sistema de administración comprende la ingestión de una célula vegetal transgénica huésped o los contenidos de la célula huésped que comprenden las moléculas de ARN transcritas en la célula huésped. En estas y otras modalidades adicionales, 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 los ácidos nucleicos que codifican una molécula de ARNi particular pueden producirse mediante el uso de tecnologías de ADN recombinante (dichas 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 planta; y para

generar la célula vegetal transgénica o la planta transgénica que contiene la molécula de ARNi transcrita.

Para impartir protección a una planta transgénica contra las plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), una molécula de ADN recombinante puede, por ejemplo, transcribirse a una molécula de ARNi, tal como una molécula de ARNdh, una molécula de ARNip, una molécula de miARN, una molécula de ARNhp, o una molécula de ARNh. 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 los fluidos de la planta recombinante. Dicha molécula de ARNdh puede estar compuesta en parte de un polinucleótido que es idéntico a un polinucleótido correspondiente transcrito a partir de un ADN dentro de una plaga de insectos de un tipo que puede infestar la planta huésped. La expresión de un gen objetivo dentro de la plaga se suprime por medio de la molécula de ARNdh, y la supresión de la expresión del gen objetivo en la plaga resulta en la protección de la planta transgénica contra la plaga. Los efectos moduladores de las moléculas de ARNdh han demostrado ser aplicables a una variedad de genes expresados en plagas, que incluyen, por ejemplo, genes endógenos responsables del metabolismo celular o la transformación celular, que incluyen genes constitutivos; factores de transcripción; genes relacionados con la muda; y otros genes que codifican polipéptidos que participan en el metabolismo celular o el crecimiento y desarrollo normales.

Para la transcripción de un transgén *in vivo* o un constructo de expresión, una región reguladora (por ejemplo, promotor, potenciador, silenciador, y señal de poliadenilación) puede usarse en algunas modalidades para transcribir la hebra (o hebras) de ARN. Por lo tanto, en algunas modalidades, tal como se indicó, *supra*, un polinucleótido para su uso en la producción de moléculas de ARNi puede unirse operativamente a uno o más elementos promotores funcionales en una célula vegetal huésped. El promotor puede ser un promotor endógeno, que reside normalmente en el genoma del huésped. El polinucleótido de la presente invención, bajo

el control de un elemento promotor unido operativamente, puede encontrarse flanqueado además por elementos adicionales que de manera ventajosa afectan su transcripción y/o la estabilidad de un transcrito resultante. Dichos elementos pueden ubicarse corriente arriba del promotor unido operativamente, corriente abajo del extremo 3' del constructo de expresión, y pueden aparecer tanto corriente arriba del promotor como corriente abajo del extremo 3' del constructo de expresión.

Algunas modalidades proporcionan métodos para reducir el daño a una planta huésped (por ejemplo, una planta de maíz, canola, o frijol de soja) causado por una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros) que se alimenta de la planta, en donde el método comprende proporcionar en la planta huésped una célula vegetal transformada que expresa al menos una molécula de ácido nucleico de la invención, en donde la(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) funciona(n) al ser absorbidas por la(s) plaga(s) para inhibir la expresión de un polinucleótido objetivo dentro de la(s) plaga(s), dicha inhibición de la expresión resulta en la mortalidad y/o reducción del crecimiento de la(s) plaga(s), para reducir de este modo el daño a la planta huésped causado por la(s) plaga(s). En algunas modalidades, la(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) comprende(n) moléculas de ARNdh. En estas y otras modalidades adicionales, la(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) comprende(n) moléculas de ARNdh que comprenden cada una más de un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de la plaga de coleópteros y/o hemípteros.

En algunas modalidades, la(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) consiste(n) en un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de la plaga de insectos.

En otras modalidades, se proporciona un método para aumentar el rendimiento de un cultivo de maíz, en donde 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, en donde la expresión de una molécula de

ARNi que comprende el ácido nucleico inhibe el daño y/o el crecimiento de la plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), para reducir o eliminar de este modo una pérdida de 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 adicionales, la(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) comprende(n) moléculas de ARNdh que comprenden cada una más de un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de la plaga de insectos. En algunos ejemplos, la(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) comprende(n) un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de la plaga de coleópteros y/o hemípteros.

En algunas modalidades, se proporciona un método para modular la expresión de un gen objetivo en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros y/o hemípteros), el método comprende: transformar una célula vegetal con un vector que comprende un polinucleótido que codifica al menos una molécula de ARNi de la invención, en donde el polinucleótido se une operativamente a un promotor y a un elemento de terminación de la transcripción; cultivar la célula vegetal transformada bajo 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 tienen el polinucleótido integrado en sus genomas; cribar las células vegetales transformadas para detectar la expresión de una molécula de ARNi codificada por el polinucleótido integrado; seleccionar una célula vegetal transgénica que expresa la molécula de ARNi; y alimentar 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 adicionales, la(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) comprende(n) moléculas de ARNdh que comprenden cada una más de un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de la

plaga de insectos. En algunos ejemplos, la(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) comprende(n) un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de la plaga de coleópteros y/o hemípteros.

Las moléculas de ARNi de la invención pueden incorporarse dentro de las semillas de una especie vegetal (por ejemplo, maíz, canola o frijol de soja), ya sea como un producto de la 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 la semilla antes de la siembra. Una célula vegetal que comprende un gen recombinante se considera un evento transgénico. También se incluyen en modalidades de la invención los sistemas de administración para la administración de 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 una plaga. Los métodos para la introducción pueden incluir la mezcla directa del ARNi con el tejido vegetal de un huésped de la(s) plaga(s) de insectos, así como también la aplicación de composiciones que comprenden moléculas de ARNi de la invención al tejido vegetal huésped. Por ejemplo, las moléculas de ARNi pueden rociarse sobre una superficie vegetal. De manera alternativa, una molécula de ARNi puede expresarse en un microorganismo, y el microorganismo puede aplicarse sobre la superficie vegetal, o introducirse a una raíz o tallo mediante un medio físico tal como una inyección. Tal como se discutió, *supra*, una planta transgénica también puede manipularse genéticamente para expresar al menos una molécula de ARNi en una cantidad suficiente para causar la muerte de las plagas de insectos conocidas como infestadoras de la planta. Las moléculas de ARNi producidas mediante síntesis química o enzimática también pueden formularse en una manera coherente con las prácticas agrícolas comunes, y usarse como productos rociables o cebos para el control del daño a las plantas causado por una plaga de insectos. Las formulaciones pueden incluir los adherentes y humectantes apropiados requeridos para la cobertura eficiente del follaje, así como también protectores de UV para proteger las moléculas de ARNi (por

ejemplo, moléculas de ARNdh) del daño causado por la luz UV. Dichos aditivos se usan comúnmente en la industria de bioinsecticidas, y son muy conocidos por los expertos en la técnica. Dichas aplicaciones pueden combinarse con otras aplicaciones de insecticidas rociables (de base biológica o de otro modo) para mejorar la protección de las plantas contra las plagas.

Todas las referencias, que incluyen publicaciones, patentes, y solicitudes de patentes, citadas en la presente invención se incorporan de esta manera como referencia en la medida en que no sean inconsistentes con los detalles explícitos de esta descripción, y de esta manera se incorporan en la misma medida como si cada una de las referencias se indicara individualmente y específicamente como incorporada a modo de referencia y se expusiera en su totalidad en la presente invención. Las referencias discutidas en la presente invención se proporcionan solamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente invención debe considerarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a antedatar dicha descripción en virtud de una invención previa.

Los siguientes Ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o aspectos particulares. Estos Ejemplos no deben considerarse como limitantes de la presente descripción a las características o aspectos particulares que se describen.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Materiales y métodos

Preparación de muestras y bioensayos

Una serie de moléculas de ARNdh (que incluyen las correspondientes a reg1 de *spt5* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5), reg1 de *spt5-2* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6), v1 de *spt5-1* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7), y v2 de *spt5-1* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8) se sintetizaron y purificaron con el uso de un estuche MEGASCRIP[®] T7 RNAi Kit (LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad, CA) o el estuche T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (NEW ENGLAND BIOLABS,

Whitby, Ontario). Las moléculas de ARNdh purificadas se prepararon en tampón TE, y todos los bioensayos contenían un tratamiento de control que consistía en este tampón, que sirvió como testigo de fondo para la mortalidad o la inhibición del crecimiento de WCR (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Las concentraciones de las moléculas de ARNdh en el tampón de bioensayo se midieron con el uso de un espectrofotómetro NANODROP™ 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE).

Las muestras se sometieron a prueba para determinar la actividad de los insectos en bioensayos realizados con larvas de insectos neonatos con una dieta artificial para insectos. Los huevos de WCR se obtuvieron de CROP CHARACTERISTICS, INC. (Farmington, MN).

Los bioensayos se realizaron en bandejas de plástico de 128 pocillos diseñadas específicamente para bioensayos con insectos (C-D INTERNACIONAL, Pitman, NJ). Cada uno de los pocillos contenía aproximadamente 1.0 ml de una dieta artificial diseñada para el crecimiento de insectos coleópteros. Una alícuota de 60 µl de muestra de ARNdh se administró mediante pipeta sobre la superficie de la dieta de cada uno de los pocillos (40 µl/cm²). Las concentraciones de las muestras de ARNdh se calcularon 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 hasta que el líquido sobre la superficie de la dieta se evaporó o se absorbió en la dieta.

A las pocas horas de eclosión, se recogieron larvas individuales con un cepillo de pelo de camello humedecido y se depositaron sobre la dieta tratada (una o dos larvas por pocillo). Después, los pocillos infestados de las bandejas de plástico de 128 pocillos se sellaron con láminas adhesivas de plástico transparente, y se ventilaron para permitir el intercambio de gases. Las bandejas de bioensayo se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas (28 °C, ~40 % de humedad relativa, 16:8 (luz:oscuridad)) durante 9 días, después de ese tiempo se registró la cantidad total de insectos expuestos a cada una de las muestras, la cantidad de insectos muertos, y el peso de los insectos supervivientes. El porcentaje de

mortalidad promedio y la inhibición del crecimiento promedio se calcularon para cada uno de los tratamientos. La inhibición del crecimiento (GI) se calculó de la siguiente manera:

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

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

5 TNIT es la cantidad total de insectos en el tratamiento;

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

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

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

La LC₅₀ (concentración letal) se define como la dosis a la cual el 50 % de los insectos de prueba
10 mueren. La GI₅₀ (inhibición del crecimiento) se define como la dosis a la cual el crecimiento promedio (por ejemplo, peso vivo) de los insectos de prueba es el 50 % del valor promedio observado en las muestras de testigo de fondo.

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

EJEMPLO 2: Identificación de genes objetivo candidatos

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

En una ejemplificación, se aisló el ARN total a partir de aproximadamente 0.9 g de larvas de WCR enteras de primer estadio; (4 a 5 días después de la eclosión; mantenidas a 16 °C), y se purificó con el uso del siguiente método basado en fenol/TRI REAGENT® (MOLECULAR
25 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. Después de la incubación durante 5 min a temperatura ambiente, el homogeneizado se dispensó 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. Después de permitir que la extracción se asentara a temperatura ambiente durante 10 min, las fases se separaron mediante centrifugación a 12,000 x g a 4 °C. La fase superior (que comprende aproximadamente 0.6 ml) se transfirió cuidadosamente a otro tubo de 1.5 ml estéril, y se agregó un volumen igual de isopropanol a temperatura ambiente. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 5 a 10 min, la mezcla se centrifugó 8 min a 12,000 x g (4 °C o 25 °C).

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

La calidad del ARN se determinó mediante la corrida de una alícuota en un gel de agarosa al 1 %. La solución de gel de agarosa se preparó con el uso de tampón TAE 10x esterilizado en autoclave (Tris-acetato EDTA; 1x de concentración es 0.04 M de Tris-acetato, 1 mM de EDTA (sal sódica de ácido etilendiaminotetraacético), pH 8.0) diluido con agua tratada con DEPC (pirocarbonato de dietilo) en un recipiente esterilizado en autoclave. Se usó TAE 1x como tampón de corrida. Antes de su uso, el tanque de electroforesis y el peine formador de pocillos se limpiaron con RNaseAway[™] (INVITROGEN INC., Carlsbad, CA). Dos µl de muestra de ARN se mezclaron con 8 µl de tampón TE (10 mM de Tris HCl pH 7.0; 1 mM de EDTA) y 10 µl de

tampón de muestra de ARN (NOVAGEN® núm. de Catálogo 70606; EMD4 Bioscience, Gibbstown, NJ). La muestra se calentó a 70 °C durante 3 min, se enfrió a temperatura ambiente, y se aplicaron 5 µl (que contenían 1 µg a 2 µg de ARN) por pocillo. Marcadores de peso molecular de ARN disponibles comercialmente se corrieron simultáneamente en pocillos
5 separados para la comparación del tamaño molecular. El gel se corrió a 60 voltios durante 2 h.

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

Las bibliotecas de ARN total y ADNc normalizado se prepararon de manera similar a partir de
15 materiales recolectados en otras etapas del desarrollo del WCR. Se construyó una biblioteca de transcriptomas agrupados para el cribado de genes objetivo mediante la combinación de los elementos de la biblioteca de ADNc que representan las diversas etapas del desarrollo.

Se hipotetizó que los genes candidatos a objetivos de la iARN son aquellos esenciales para la supervivencia y el crecimiento en los insectos de la plaga. Se identificaron los homólogos de
20 genes objetivo seleccionados en la base de datos de las secuencias de transcriptomas, tal como se describe a continuación. Las secuencias de longitud completa o parcial de los genes objetivo se amplificaron mediante PCR para preparar las plantillas para la producción de ARN de doble hebra (ARNdh).

Las búsquedas por TBLASTN con el uso de las secuencias codificantes de proteína candidatas
25 se ejecutaron contra las bases de datos procesables por BLAST que contienen las lecturas de secuencias no ensambladas de *Diabrotica* o los cóntigos ensamblados. Los aciertos

significativos para una secuencia de *Diabrotica* (definidos como mejores que e^{-20} para homologías de cóntigos y mejores que e^{-10} para 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
5 candidatos homólogos de *Diabrotica* identificadas en la búsqueda por TBLASTN comprendían realmente genes de *Diabrotica*, o eran el mejor acierto para la secuencia de genes candidatos no pertenecientes a *Diabrotica* presentes en las secuencias de *Diabrotica*. En unos pocos casos, fue evidente que algunos de los cóntigos de *Diabrotica* o lecturas de secuencias no ensambladas seleccionados por homología a un gen candidato no perteneciente a *Diabrotica* se
10 superponían, y que el ensamble de los cóntigos no logró unir estas superposiciones. En esos casos, se usó Sequencher™ v4.9 (GEN CODES CORPORATION, Ann Arbor, MI) para ensamblar las secuencias en cóntigos de mayor longitud.

Varios genes objetivo candidatos que codifican *spt5* de *Diabrotica* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3) se identificaron como genes que pueden conducir a
15 la mortalidad de plagas de coleópteros, la inhibición del crecimiento, la inhibición del desarrollo, y/o la inhibición de la alimentación en WCR.

El gen *spt5* del factor de elongación de la transcripción de *Drosophila* consiste en un dominio NusG (NGN) amino terminal y un dominio Kyprides-Onzonis-Woese (KOW) C-terminal, que actúa como un regulador transcripcional dual que funciona como factor de elongación tanto
20 negativo como positivo. El dominio NGN de *spt5* se une a RNAP mientras que el(los) dominio(s) KOW recluta(n) factores reguladores adicionales para RNAP. Se considera que el dominio KOW de eucariotas permite el reclutamiento de un mayor número de factores de transcripción. Además, *spt5* también puede participar en la regulación del procesamiento del preARNm, ya que interactúa con la enzima formadora de caperuza. Junto con la proteína SPT4 de dedos de
25 cinc pequeña (supresor de Ty 4), SPT5 forma el complejo heterodimérico DSIF (factor inductor de sensibilidad a DRB (5,6-dicloro-1-β-D-ribofuranosilbencimidazol)).

Los transgenes de ARNdh de *spt5* 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 dirigidos a *spt5* son útiles para prevenir el daño causado por el gusano de la raíz del maíz al alimentarse de las raíces. Los transgenes de ARNdh de *spt5* representan nuevos modos de acción para la combinación con la tecnología de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* en las pirámides de genes para el manejo de la resistencia de los insectos para mitigar el desarrollo de poblaciones de gusano 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 las secuencias de un gen candidato de *Diabrotica*, referido en la presente invención como *spt5*, para generar amplicones de PCR para la síntesis del ARNdh. Se diseñaron cebadores para amplificar porciones de las regiones codificantes de cada gen objetivo mediante PCR. Ver la **Tabla 1**. Cuando fue apropiado, una secuencia promotora de fago T7 (TTAATACGACTCACTATAGGGAGA; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9) se incorporó en los extremos 5' de las hebras sentido o antisentido amplificadas. Ver la **Tabla 1**. El ARN total se extrajo a partir de WCR con el uso de TRIzol® (Life Technologies, Grand Island, NY), y después se usó para preparar el ADNc de primera hebra con el sistema de síntesis de primera hebra SuperScriptIII® y las instrucciones del fabricante para el cebado con Oligo dT (Life Technologies, Grand Island, NY). El ADNc de primera hebra se usó como plantilla para las reacciones de PCR con el uso de cebadores opuestos posicionados para amplificar la totalidad o parte de la secuencia del gen objetivo nativo. El ARNdh también se amplificó a partir de un clon de ADN que comprende 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 usados para amplificar porciones de las regiones codificantes del gen objetivo *spt5* ilustrativo y el gen *YFP* de control negativo.

	ID del Gen	ID del Cebador	Secuencia
5	Par 1 <i>spt5-1</i>	Dvv-spt5-1_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAATTGAAG AAGTATTTCAAACCTGGAG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:11)
		Dvv-spt5-1_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGTAGAGA AATGCGAAATTTCTATAGAG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:12)
10	Par 2 <i>spt5-2</i>	Dvv-spt5-2_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCGCATCG GCGAGGAAAAGATAAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:13)
15		Dvv-spt5-2_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACGAATGGTT TTGCTGGTGGACGAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:14)
20	Par 3 <i>spt5-2 v1</i>	Dvv-spt5-1_v1_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGAGTAGAA AATAACAGAGTCGTATTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:15)
		Dvv-spt5-1_v1_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGATAGTGAATC GACACCACTAGCCATATC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:16)

5	Par 4	<i>spt5-2 v1</i>	Dvv-spt5-1_v2_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCGGAAC AATTTACATAGAAGAGATATG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:17)
			Dvv-spt5-1_v2_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGTAGAGA AATGCGAAATTTCTATAGAG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:18)
10	Par 5	YFP	YFP-F_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACACCATGGG CTCCAGCGGCGCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:26)
			YFP-R_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGATCTTGA AGGCGCTCTTCAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:29)

EJEMPLO 4: Constructos de iARN

15 Preparación de las plantillas mediante PCR y síntesis del ARNd_h

Una estrategia usada para proporcionar las plantillas específicas para la producción de ARNd_h de *spt5* y *YFP* se muestra en la **Figura 1**. Las plantillas de ADN proyectadas para su uso en la síntesis de ARNd_h de *spt5* se prepararon mediante PCR con el uso de los pares de cebadores en la **Tabla 1** y el ADN_c de primera hebra (como plantilla de PCR) preparado a partir del ARN

20 total aislado de huevos, larvas de primer estadio, o adultos de WCR. Para cada región de los genes objetivo *spt5* y *YFP* seleccionada, las amplificaciones por PCR introdujeron una secuencia promotora T7 en los extremos 5' de las hebras sentido y antisentido amplificadas (el segmento YFP se amplificó a partir de un clon de ADN de la región codificante de *YFP*). Los

25 dos fragmentos amplificados por PCR para cada región de los genes objetivo se mezclaron después en cantidades aproximadamente iguales, y la mezcla se usó como plantilla de transcripción para la producción de ARNd_h. Ver la **Figura 1**. Las secuencias de las plantillas de

ARNdh amplificadas con los pares de cebadores particulares fueron: la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5 (reg1 de *spt5-1*), la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6 (reg1 de *spt5-2*), la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7 (v1 de *spt5-1*), la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8 (v2 de *spt5-1*), y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10 (YFP). El ARN de doble hebra para el bioensayo con insectos se sintetizó y purificó con el uso de un estuche AMBION® MEGASCRIP™ RNAi Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (INVITROGEN) o el estuche HiScribe® T7 In Vitro Transcription Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA). Las concentraciones de ARNdh se midieron con el uso de un espectrofotómetro NANODROP™ 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE).

10 Construcción de vectores de transformación de plantas

Los vectores de entrada que albergan un constructo de gen objetivo para la formación de la horquilla que comprende segmentos de *spt5* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3) se ensamblan con el uso de una combinación de fragmentos sintetizados químicamente (DNA2.0, Menlo Park, CA) y métodos de clonación molecular estándar. La

15 formación de horquilla intramolecular en transcritos primarios de ARN se facilita mediante la disposición (dentro de una sola unidad de transcripción) de dos copias de un segmento de secuencia del gen objetivo *spt5* en orientaciones opuestas entre sí, los dos segmentos están separados por un polinucleótido enlazador (por ejemplo, un bucle (tal como la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:105) y un intrón ST-LS1 (Vancanneyt *et al.* (1990) Mol. Gen. Genet. 220(2):245-50)).

20 Por consiguiente, el transcrito primario ARNm contiene las dos secuencias de segmentos del gen *spt5* como grandes repeticiones invertidas entre sí, separadas por una secuencia enlazadora. Una copia de un promotor (por ejemplo, ubiquitina 1 del maíz, Patente de EE.UU. 5,510,474; 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV); promotor de badnavirus baciliforme de la caña de azúcar (ScBV); promotores de genes de actina del arroz; promotores de

25 ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 del maíz; promotor de ALS; promotor del gen de faseolina; *cab*; *rubisco*; *LAT52*; *Zm13*; y/o *apg*) se usa para activar la producción del

transcrito primario de ARNm de horquilla, y un fragmento que comprende una región no traducida 3' (por ejemplo un gen de peroxidasa 5 del maíz (v2 de Zm3'Per5 UTR; Patente de EE.UU. 6,699,984), AtUbi10, AtEf1, o StPinII) se usa para terminar la transcripción del gen que expresa el ARN de horquilla.

- 5 Los vectores de entrada se usan en reacciones de recombinación GATEWAY® estándares con un vector de destino binario típico para producir vectores de transformación para la expresión de ARN de horquilla de *spt5* para transformaciones de embriones de maíz mediadas por *Agrobacterium*.

El vector de destino binario comprende un gen de tolerancia a herbicidas (ariloxialcanoato dioxigenasa; v3 de AAD-1) (Patente de EE.UU. 7,838,733 (B2), y Wright *et al.* (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 107:20240-5) bajo la regulación de un promotor operativo en plantas (por ejemplo, promotor de badnavirus baciliforme de la caña de azúcar (ScBV) (Schenk *et al.* (1999) Plant Mol. Biol. 39:1221-30) o ZmUbi1 (Patente de EE.UU. 5,510,474)). Una 5'UTR y un enlazador se posicionan entre el extremo 3' del segmento promotor y el codón de inicio de la
10 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 EE.UU. 7,179,902) se usa para terminar la transcripción del ARNm de AAD-1.
15

Un vector binario de control negativo, que comprende un gen que expresa una proteína YFP, se construye por medio de reacciones de recombinación GATEWAY® estándares con un vector de
20 destino binario típico y un vector de entrada. El vector de destino binario comprende un gen de tolerancia a herbicidas (ariloxialcanoato dioxigenasa; v3 de AAD-1) (como se indicó anteriormente) bajo la regulación de la expresión de un promotor de ubiquitina 1 del maíz (tal como se indicó anteriormente) y un fragmento que comprende una región no traducida 3' de un gen de lipasa del maíz (ZmLip 3'UTR; tal como se indicó anteriormente). El vector de entrada
25 comprende una región codificante de YFP (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:19) bajo el control de la expresión de un promotor de ubiquitina 1 del maíz (tal como se indicó anteriormente) y un

fragmento que comprende una región no traducida 3' de un gen de peroxidasa 5 del maíz (tal como se indicó anteriormente).

EJEMPLO 5: Cribado de genes objetivo candidatos

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

Los bioensayos replicados demostraron que la ingestión de preparaciones de ARNdh derivados de reg1 de *spt5-2*, v1 de *spt5-2*, y v2 de *spt5-2* resultó en la mortalidad y/o inhibición del
10 crecimiento de larvas del gusano de la raíz del maíz occidental. La **Tabla 2** muestra los resultados de los bioensayos de alimentación basados en la dieta de larvas de WCR después de 9 días de exposición a estos ARNdh de reg1 de *spt5-2*, v1 de *spt5-2*, y v2 de *spt5-2*, así como también los resultados obtenidos con una muestra de control negativo de ARNdh preparado a partir de una región codificante de la proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEC.
15 CON NÚM. DE IDENT.:10). La **Tabla 3** muestra los resultados de LC₅₀ y GI₅₀ de la exposición a ARNdh de v1 de *spt5-2* y v2 de *spt5-2*.

Tabla 2. Resultados de los ensayos de alimentación con dieta de ARNdh de *spt5* obtenidos con larvas del gusano de la raíz del maíz occidental después de 9 días de alimentación. El análisis
20 ANOVA encontró diferencias significativas en la media del % de mortalidad y la media del % de inhibición del crecimiento (GI). Las medias se separaron con el uso de la prueba de Tukey-Kramer.

Nombre del gen	Dosis (ng/cm ²)	N	(% de Mortalidad) Media ± SEM*	(GI) Media ± SEM
Reg1 de <i>spt5-1</i>	500	4	98.53 ± 1.47 (A)	1.00 ± 0.01 (A)
v1 de <i>spt5-1</i>	500	11	87.68 ± 1.86 (A)	0.97 ± 0.01 (A)
v2 de <i>spt5-1</i>	500	9	87.17 ± 3.16 (A)	0.97 ± 0.01 (A)
TE**	0	20	6.93 ± 1.86 (B)	0.01 ± 0.05 (BC)
AGUA	0	16	7.32 ± 1.98 (B)	-0.09 ± 0.03 (C)
YFP***	500	16	11.91 ± 3.54 (B)	0.09 ± 0.06 (B)

*SEM =error estándar de la media. Las letras en paréntesis designan los niveles estadísticos. Los niveles no relacionados por la misma letra son significativamente diferentes (P<0.05).

**TE = tampón Tris HCl (1 mM) más EDTA (0.1 mM), pH7.2.

***YFP = proteína fluorescente amarilla

Tabla 3.Resumen de la potencia oral de ARNdh de *spt5* en larvas de WCR (ng/cm²).

Nombre del gen	LC ₅₀	Rango	GI ₅₀	Rango
v1 de <i>spt5-1</i>	46.41	34.40 - 63.29	18.22	11.28 - 29.43
v2 de <i>spt5-1</i>	13.05	8.88 - 18.88	2.92	1.60 - 5.33

Previamente se ha sugerido que ciertos genes de *Diabrotica* spp. pueden explotarse para el control de insectos mediado por la iARN. Ver la Publicación de Patente de EE.UU. núm. 2007/0124836, que describe 906 secuencias, y la Patente de EE.UU. núm. 7,612,194, que describe 9,112 secuencias. Sin embargo, se determinó que muchos genes sugeridos como útiles para el control de insectos mediado por la iARN no son eficaces para el control de *Diabrotica*. También se determinó que los ARNdh con secuencias de reg1 de *spt5-2*, v1 de

spt5-2, y v2 de *spt5-2* proporcionan un control superior sorprendente e inesperado de *Diabrotica*, en comparación con otros genes sugeridos como útiles para el control de insectos mediado por la iARN

Por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 7,612,194 se sugirió que cada uno de los genes *anexina*,

5 *beta espectralina 2*, y *mtRP-L4* son eficaces en el control de insectos mediado por la iARN. La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:20 es la secuencia de ADN de la región 1 (Reg 1) de *anexina*, y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:21 es la secuencia de ADN de la región 2 (Reg 2) de *anexina*. La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:22 es la secuencia de ADN de la región 1 (Reg 1) de *beta espectralina 2*, y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:23 es la secuencia de ADN de la región 2 (Reg2) de *beta espectralina 2*. La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:24 es la secuencia de ADN de la región 1 (Reg 1) de *mtRP-L4*, y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:25 es la secuencia de ADN de la región 2 (Reg 2) de *mtRP-L4*. Una secuencia de YFP (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10) también se usó para producir ARNdh como un control negativo.

Cada una de las secuencias mencionadas anteriormente se usó para producir ARNdh mediante
15 los métodos del EJEMPLO 3. La estrategia usada para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNdh se muestra en la **Figura 2**. Las plantillas de ADN proyectadas para su uso en la síntesis del ARNdh se prepararon mediante PCR con el uso de los pares de cebadores en la **Tabla 4** y ADNc de primera hebra (como plantilla de PCR) preparado a partir del ARN total aislado de larvas de WCR de primer estadio. (YFP se amplificó a partir de un clon
20 de ADN). Para cada región de gen objetivo seleccionada, se realizaron dos amplificaciones por PCR separadas. La primera amplificación por PCR introdujo una secuencia promotora T7 en el extremo 5' de las hebras sentido amplificadas. La segunda reacción incorporó la secuencia promotora T7 en los extremos 5' de las hebras antisentido. Los dos fragmentos amplificados por PCR para cada región de los genes objetivo se mezclaron después en cantidades
25 aproximadamente iguales, y la mezcla se usó como plantilla de transcripción para la producción de ARNdh. Ver la **Figura 2**. El ARN de doble hebra se sintetizó y purificó con el uso de un

estuche AMBION® MEGAscript® RNAi Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (INVITROGEN). Las concentraciones de los ARNdh se midieron con el uso de un espectrofotómetro NANODROP™ 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE), y cada uno de los ARNdh se sometió a prueba mediante los mismos métodos de bioensayo basados en la dieta descritos anteriormente. La **Tabla 4** relaciona las secuencias de los cebadores usados para producir las moléculas de ARNdh de Reg1 de *anexina*, Reg2 de *anexina*, Reg1 de *beta espectralina 2*, Reg2 de *beta espectralina 2*, Reg1 de *mtRP-L4*, Reg2 de *mtRP-L4*, y YFP. La **Tabla 5** presenta los resultados de los bioensayos de alimentación basados en la dieta de larvas de WCR después de 9 días de exposición a estas moléculas de ARNdh. Los bioensayos replicados demostraron que la ingestión de estos ARNdh no resultó en mortalidad ni inhibición del crecimiento de las larvas del gusano de la raíz del maíz occidental superiores a las observadas con las muestras de control de tampón TE, agua, o proteína YFP.

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

	Gen (Región)	ID Cebador	Secuencia
Par 6	YFP	YFP-F_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACACCATGGGCT CCAGCGGCGCCC (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	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGATCTTGAAG GCGCTCTTCAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:29)

Par 8	Anexina (Reg 1)	Ann-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTCCAACAGT GGTTCCTTATC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:30)
	Anexina (Reg 1)	Ann-R1	CTAATAATTCTTTTTTAATGTTCTGAGG (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	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTAATAATTCTT TTTTAATGTTCTGAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:33)
Par 10	Anexina (Reg 2)	Ann-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGATTGTTACAAGC TGGAGAACTTCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:34)
	Anexina (Reg 2)	Ann-R2	CTTAACCAACAACGGCTAATAAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:35)
Par 11	Anexina (Reg 2)	Ann-F2	TTGTTACAAGCTGGAGAACTTCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:36)
	Anexina (Reg 2)	Ann-R2T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTTAACCAACA ACGGCTAATAAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:37)
Par 12	Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2- F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGATGTTGGCT GCATCTAGAGAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:38)
	Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-R1	GTCCATTCGTCCATCCACTGCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:39)

Par 13	Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-F1	AGATGTTGGCTGCATCTAGAGAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:40)
	Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2- R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCCATTCGTC CATCCACTGCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:41)
Par 14	Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2- F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAGATGAACA CCAGCGAGAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:42)
	Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-R2	CTGGGCAGCTTCTTGTTTCCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:43)
Par 15	Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-F2	GCAGATGAACACCAGCGAGAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:44)
	Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2- R2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTGGGCAGCTT CTTGTTTCCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:45)
Par 16	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGTGAAATGTT AGCAAATATAACATCC (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	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGAACCTCTCACTT CAAATCTTGACTTTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:49)

Par 18	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAGTCAAGAT TTGAAGTGAGAGGT (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	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTACAAATAAAAC AAGAAGGACCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:53)

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

Nombre del gen	Dosis (ng/cm ²)	Media del Peso Larval Vivo (mg)	Media del % de Mortalidad	Media de Inhibición del crecimiento
<i>anexina</i>-Reg 1	1000	0.545	0	-0.262
<i>anexina</i>-Reg 2	1000	0.565	0	-0.301
Reg 1 de <i>beta</i> <i>espectrina 2</i>	1000	0.340	12	-0.014
Reg 2 de <i>beta</i> <i>espectrina 2</i>	1000	0.465	18	-0.367
Reg 1 de <i>mtRP-L4</i>	1000	0.305	4	-0.168
Reg 2 de <i>mtRP-L4</i>	1000	0.305	7	-0.180
tampón TE*	0	0.430	13	0.000
Agua	0	0.535	12	0.000
YFP**	1000	0.480	9	-0.386

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

**YFP = proteína fluorescente amarilla

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

Transformación mediada por *Agrobacterium*. Las células, tejidos, y plantas de maíz transgénico que producen una o más moléculas de ARNdh insecticidas (por ejemplo, al menos una molécula de ARNdh que incluye una molécula de ARNdh dirigida a un gen que comprende *spt5* (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 de manera estable en el genoma de la planta se producen mediante la transformación mediada por *Agrobacterium*. Los métodos de transformación del maíz que usan vectores de transformación superbinarios o binarios son conocidos en la técnica, tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 8,304,604, que se incorpora en la presente invención como referencia en su totalidad. Los tejidos transformados se seleccionan por su capacidad de crecer en un medio que contiene Haloxifop y se criban para detectar la producción de ARNdh, según corresponda. Porciones de dichos cultivos de tejido transformado pueden presentarse a las larvas del gusano de la raíz del maíz neonatas para el bioensayo, esencialmente tal como se describió en el EJEMPLO 1.

Inicio del cultivo de *Agrobacterium*. Reservas en glicerol de células de la cepa de *Agrobacterium* DAT13192 (Publicación Internacional PCT núm. WO 2012/016222A2) que albergan un vector de transformación binario descrito anteriormente (EJEMPLO 4) se siembran por estrías en placas de medio mínimo AB (Watson *et al.* (1975) J. Bacteriol. 123:255-264) que contienen antibióticos apropiados y se cultivan a 20 °C durante 3 días. Después, los cultivos se siembran por estrías en placas de YEP (g/l: extracto de levadura, 10; peptona, 10; NaCl, 5) que contienen los mismos antibióticos y se incuban a 20 °C durante 1 día.

Cultivo de *Agrobacterium*. En el día del experimento, se prepara una solución de reserva de

medio de inoculación y acetosiringona en un volumen apropiado para la cantidad de constructos en el experimento y se introduce mediante pipeta en un matraz estéril, desechable, de 250 ml. El medio de inoculación (Frame *et al.* (2011) *Genetic Transformation Using Maize Inmature Zygotic Embryos*. En Plant Embryo Culture Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. T. A. Thorpe y E. C. Yeung, (Eds), Springer Science and Business Media, LLC. pp 327-341) contenía: 2.2 g/l de sales MS; vitaminas MS modificadas por ISU 1X (Frame *et al.*, *ibid*). 68.4 g/l de sacarosa; 36 g/l de glucosa; 115 mg/l de L-prolina; y 100 mg/l de mioinositol; a pH 5.4). La acetosiringona se agrega al matraz que contiene el medio de inoculación hasta una concentración final de 200 µM a partir de una solución de reserva 1 M en sulfóxido de dimetilo al 100 % y la solución se mezcla completamente.

Para cada constructo, se suspenden 1 o 2 asas de inoculación llenas de *Agrobacterium* de la placa de YEP en 15 ml de solución de reserva de medio de inoculación/acetosiringona en un tubo de centrifuga estéril, desechable, de 50 ml, y se mide la densidad óptica de la solución a 550 nm (OD₅₅₀) en un espectrofotómetro. La suspensión se diluye después hasta una OD₅₅₀ de 0.3 a 0.4 con el uso de mezclas adicionales de medio de inoculación/acetosiringona. Después, el tubo de la suspensión de *Agrobacterium* se coloca horizontalmente en un agitador de plataforma configurado a aproximadamente 75 rpm a temperatura ambiente y se agita durante 1 a 4 horas mientras se realiza la disección de los embriones.

Esterilización de espigas y aislamiento de embriones. Los embriones inmaduros de maíz se obtienen a partir de plantas de la línea endogámica B104 de *Zea mays* (Hallauer *et al.* (1997) Crop Science 37:1405-1406) cultivadas en el invernadero y autopolinizadas o polinizadas entre hermanas para producir espigas. Las espigas se recolectan aproximadamente a los 10 a 12 días después de la polinización. En el día del experimento, la superficie de las espigas sin chala se esteriliza mediante inmersión en una solución de lejía comercial al 20 % (Lejía Germicida ULTRA CLOROX®, hipoclorito de sodio al 6.15 %; con dos gotas de TWEEN 20) y se agita durante 20 a 30 min, seguido por tres enjuagues en agua desionizada estéril en una campana

de flujo laminar. Los embriones cigóticos inmaduros (1.8 a 2.2 mm de longitud) se diseccionan asépticamente de cada espiga y se distribuyen aleatoriamente en tubos de microcentrifuga que contienen 2.0 ml de una suspensión de células de *Agrobacterium* apropiadas en medio de inoculación líquido con 200 μ M de acetosiringona, a la cual se agregan 2 μ l de agente tensioactivo BREAK-THRU® S233 al 10 % (EVONIK INDUSTRIES; Essen, Alemania). Para un conjunto de experimentos dado, los embriones de las espigas agrupadas se usan para cada transformación.

Cocultivo de *Agrobacterium*. Después del aislamiento, los embriones se colocan en una plataforma oscilante durante 5 minutos. Después, los contenidos del tubo se vierten en una placa de medio de cocultivo, que contiene 4.33 g/l de sales MS; vitaminas MS modificadas por ISU 1X; 30 g/l de sacarosa; 700 mg/l de L-prolina; 3.3 mg/l de dicamba en KOH (ácido 3,6-dicloro-o-anísico o ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico); 100 mg/l de mioinositol; 100 mg/l de hidrolizado enzimático de caseína; 15 mg/l de AgNO_3 ; 200 μ M de acetosiringona en DMSO; y 3 g/l de GELZAN™, a pH 5.8. La suspensión líquida de *Agrobacterium* se retira con una pipeta de transferencia estéril, desechable. Después, los embriones se orientan con el escutelo hacia arriba con el uso de pinzas estériles con la ayuda de un microscopio. La placa se cierra, se sella con cinta médica 3M™ MICROPORE™, y se coloca en una incubadora a 25 °C con luz continua a aproximadamente 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés).

Selección de callos y regeneración de eventos transgénicos. Después del período de cocultivo, los embriones se transfieren a medio de reposo, compuesto por 4.33 g/l de sales MS; vitaminas MS modificadas por ISU 1X ; 30 g/l de sacarosa; 700 mg/l de L-prolina; 3.3 mg/l de dicamba en KOH; 100 mg/l de mioinositol; 100 mg/l de hidrolizado enzimático de caseína; 15 mg/l de AgNO_3 ; 0.5 g/l de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico monohidratado; PHYTOTECNOLOGIES LABR.; Lenexa, KS); 250 mg/l de carbenicilina; y 2.3 g/l de GELZAN™; a pH 5.8. A cada placa se trasladan 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. Después, los embriones con callos se transfieren (<18/placa) a medio de selección I, que comprende medio de reposo (mencionado anteriormente) con 100 nM de ácido R-Haloxifop (0.0362 mg/l; para la selección

5 de los callos que albergan el gen *AAD-1*). Las placas se vuelven a colocar en 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. Después, los embriones con callos se transfieren (<12/placa) a medio de selección II, que comprende medio de reposo (mencionado anteriormente) con 500 nM de ácido R-Haloxifop (0.181 mg/l). Las placas se vuelven a colocar en las cajas transparentes y se

10 incuban a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR durante 14 días. Esta etapa de selección permite que los callos transgénicos proliferen y se diferencien aún más. Los callos embriogénicos en proliferación, se transfieren (<9/placa) a medio de prerregeneración. El medio de prerregeneración contiene 4.33 g/l de sales MS; vitaminas MS modificadas por ISU 1X; 45 g/l de sacarosa; 350 mg/l de L-prolina; 100 mg/l de mioinositol; 50

15 mg/l de hidrolizado enzimático de caseína; 1.0 mg/l de AgNO_3 ; 0.25 g/l de MES; 0.5 mg/l de ácido naftalenacético en NaOH; 2.5 mg/l de ácido abscísico en etanol; 1 mg/l de 6-bencilaminopurina; 250 mg/l de carbenicilina; 2.5 g/l de GELZAN™; y 0.181 mg/l de ácido Haloxifop; a pH 5.8. Las placas se almacenan en cajas transparentes y se incuban a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR durante 7 días. Los callos en

20 regeneración se transfieren después (<6/placa) a 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 desarrollen los brotes y las raíces. El medio de regeneración contiene 4.33 g/l de sales MS; vitaminas MS modificadas por ISU 1X; 60 g/l de sacarosa; 100 mg/l de mioinositol; 125 mg/l de carbenicilina; 3

25 g/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 se transfieren a medio de elongación sin selección.

El medio de elongación contiene 4.33 g/l de sales MS; vitaminas MS modificadas por ISU 1X; 30 g/l de sacarosa; y 3.5 g/l de GELRITE™: a pH 5.8.

Los brotes de plantas transformadas seleccionados por su capacidad de crecer en medio que contiene Haloxifop se trasplantan desde PHYTATRAYS™ a pequeñas macetas rellenas con medio de crecimiento (PROMIX BX; PREMIER TECH HORTICULTURE), cubiertos con cúpulas o HUMI-DOMES (ARCO PLASTICS), y después se aclimatan en una cámara de cultivo CONVIRON® (27 °C en el día/24 °C en la noche, fotoperíodo de 16-horas, 50-70 % de RH, 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR). En algunos casos, las plántulas transgénicas putativas se analizan para determinar el número de copias relativo del transgén mediante ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real con el uso de cebadores diseñados para detectar el gen *AAD1* de tolerancia a herbicidas integrado en el genoma del maíz. Además, los ensayos de qPCR se usan para detectar la presencia de la secuencia enlazadora y/o de la secuencia objetivo en los transformantes putativos. Las plántulas transformadas seleccionadas se trasladan después a un invernadero para su crecimiento y pruebas adicionales.

Transferencia y establecimiento de plantas T_0 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 cultivan hasta la floración en el invernadero (tipo de exposición a la luz: foto o asimilación; límite superior de luz: 1200 PAR; extensión del día 16 horas; 27 °C en el día/24 °C en la noche).

Las plantas que se usarán para los bioensayos con insectos se trasplantan desde las pequeñas macetas a TINUS™ 350-4 ROOTRAINERS® (SPENCER-LEMAIRE INDUSTRIES, Acheson, Alberta, Canadá); (una planta por evento por ROOTRAINERS®). Aproximadamente cuatro días después del trasplante a ROOTRAINERS®, las plantas se infestan para el bioensayo.

Las plantas de la generación T_1 se obtienen mediante la polinización de los estigmas de las plantas transgénicas T_0 con polen recolectado de plantas de la línea endogámica no transgénica B104 u otros donantes de polen apropiados, 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 los tejidos de maíz se realizan en muestras de hojas y raíces que se recolectaron de plantas cultivadas en el invernadero el mismo día o en los mismos días en que se evalúa el daño causado por la alimentación con raíces.

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

Los análisis de qPCR de ADN para detectar una porción de la región codificante de *AAD1* en el ADNg se usan para estimar el número de copias de inserción del transgén. Las muestras para estos análisis se recolectan de plantas cultivadas en cámaras ambientales. Los resultados se comparan con los resultados de qPCR de ADN de los ensayos diseñados para detectar una porción de un gen nativo de copia única, y los eventos simples (que tienen una o dos copias de los transgenes *spt5*) progresan a estudios adicionales en el invernadero.

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

del objetivo Los eventos en 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 de transcrito de un gen interno de

maíz (por ejemplo, núm. de acceso de GENBANK BT069734), que codifica una proteína tipo TIP41 (es decir, un homólogo de maíz de núm. de acceso de GENBANK AT4G34270; que tiene una puntuación tBLASTX de 74 % de identidad; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:54). El ARN se aísla con el uso de un estuche Norgen BioTek™ Total RNA Isolation Kit (Norgen, Thorold, ON).

- 5 El ARN total se somete a un tratamiento con DNAsa1 en columna de acuerdo con el protocolo sugerido en el estuche. Después, el ARN se cuantifica en un espectrofotómetro NANODROP 8000 (THERMO SCIENTIFIC) y la concentración se normaliza a 50 ng/μl. El ADNc de primera hebra se prepara con el uso de un estuche HIGH CAPACITY cDNA SYNTHESIS KIT (INVITROGEN) en un volumen de reacción de 10 μl con 5 μl de ARN desnaturalizado,
- 10 sustancialmente de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. El protocolo se modifica ligeramente para incluir la adición de 10 μl de 100 μM de oligonucleótido T20VN (IDT) (TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN, en 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 de reserva de cebadores aleatorios, para preparar una reserva de trabajo de cebadores aleatorios combinados y oligo dT.
- 15 Después de la síntesis del ADNc, las muestras se diluyen 1:3 con agua libre de nucleasas, y se almacenan a -20 °C hasta el ensayo.

- Se realizan ensayos de PCR en tiempo real separados para el gen objetivo y el transcrito tipo TIP41 en un LIGHTCYCLER™ 480 (ROCHE DIAGNOSTICS, Indianápolis, IN) en volúmenes de reacción de 10 μl. Para el ensayo del gen objetivo, las reacciones se ejecutan con los
- 20 cebadores hpSpt5-1 v1 FWD del Conjunto 1 (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:61) y hpSpt5-1 v1 REV del Conjunto 1 (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:62), y una sonda IDT oligo personalizada para v1 de *spt5-1* PRB Conjunto1, marcada con FAM y doblemente desactivada con desactivadores Zen y Iowa Black (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:63). Para el ensayo del gen de referencia tipo TIP41, se usan los cebadores TIPmxF (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:58) y
- 25 TIPmxR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:59), y la sonda HXTIP (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:60) marcada con HEX (hexaclorofluoresceína).

Todos los ensayos incluyen controles negativos sin plantilla (solamente mezcla). Para las curvas estándares, una muestra en blanco (agua en pocillo fuente) también se incluye en la placa fuente para verificar la contaminación cruzada de las muestras. Las secuencias de cebadores y sondas se presentan en la **Tabla 6**. Las recetas de los componentes de la reacción para la detección de los diversos transcritos se describen en la **Tabla 7**, y las condiciones de las reacciones de PCR se resumen en la **Tabla 8**. La fracción fluorescente FAM (6-carboxi amidita de fluoresceína) se excita a 465 nm y la fluorescencia se mide a 510 nm; los valores correspondientes para la fracción fluorescente HEX (hexaclorofluoresceína) son 533 nm y 580 nm.

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

Objetivo	Oligonucleótido	Secuencia
<i>spt5</i>	hpSpt5-1 v1 FWD Conjunto 1	AACAGAGTCGTATTGATATCTGACC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:61)
<i>spt5</i>	hpSpt5-1 v1 REV Conjunto 1	GAATCGACACCACTAGCCATATC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:62)
<i>spt5</i>	hpSpt5-1 v1 PRB Conjunto 1	/56-FAM/TGACTATGC/ZEN/ACGAAATGGAAATTCTACCA/3IABkFQ/ (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:63)
<i>spt5</i>	Spt5-1v2_196 R	CCAGAATGTGGCCCATCGAT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:64)
<i>spt5</i>	Spt5-1v2_52 P	TGCCAGTTCCAGCCAGCAGC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:65)
<i>spt5</i>	Spt5-1v2_31 F	CTGCCAGTTCCTCCCAGATG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:66)
TIP41	TIPmxF	TGAGGGTAATGCCAACTGGTT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:58)

TIP41	TIPmxR	GCAATGTAACCGAGTGTCTCTCAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:59)
TIP41	HXTIP (HEX-Sonda)	TTTTTGGCTTAGAGTTGATGGTGTACTGATGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:60)

5 *Proteína tipo TIP41.

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

	<i>spt5</i>	Gen tipo TIP
Componente	Concentración final	
Tampón de Roche	1 X	1X
<i>spt5</i> -1 v1 FWD	0.4 µM	0
<i>spt5</i> -1 v1 REV	0.4 µM	0
<i>spt5</i> -1 v1(FAM)	0.2 µM	0
HEXtipZM F	0	0.4 µM
HEXtipZM R	0	0.4 µM
HEXtipZMP (HEX)	0	0.2 µM
ADNc (2.0 µl)	NA	NA
Agua	Hasta 10 µl	Hasta 10 µl

Tabla 8.Condiciones del termociclador para qPCR de ARN.

Detección de Gen objetivo y Gen tipo TIP41			
Proceso	Temp.	Tiempo	núm. de Ciclos
Activación del objetivo	95 °C	10 min	1
Desnaturalización	95 °C	10 s	40
Extensión	60 °C	40 s	
Adquisición de FAM o HEX	72 °C	1 s	
Enfriamiento	40 °C	10 s	1

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

Tamaño e integridad del transcrito: Ensayo de transferencia Northern. En algunos casos, la caracterización molecular adicional de las plantas transgénicas se obtiene mediante el uso del análisis de transferencia Northern (transferencia de ARN) para determinar el tamaño molecular del ARN de horquilla en las plantas transgénicas que expresan un ARNdh horquilla de *spt5*.

Todos los materiales y equipos se tratan con RNaseZAP (AMBION/INVITROGEN) antes de su uso. Las muestras de tejido (100 mg a 500 mg) se recolectan en tubos SAFELOCK EPPENDORF de 2 ml, se rompen con un pulverizador de tejidos KLECKO™ (GARCIA MANUFACTURING, Visalia, CA) con tres perlas de tungsteno en 1 ml de TRIZOL (INVITROGEN) durante 5 min, después se incuban a temperatura ambiente (RT, por sus siglas en inglés) durante 10 min. Opcionalmente, las muestras se centrifugan durante 10 min a 4 °C y a 11,000 rpm, y el sobrenadante se transfiere a un tubo SAFELOCK EPPENDORF de 2 ml nuevo. Después de agregar 200 µl de cloroformo al homogeneizado, el tubo se mezcla por inversión durante 2 a 5 min, se incuba a RT durante 10 minutos, y se centrifuga a 12,000 x g durante 15 min a 4 °C. La fase superior se transfiere a un tubo EPPENDORF de 1.5 ml estéril, se agregan 600 µl de isopropanol al 100 %, se incuba a RT durante 10 min hasta 2 h, y después se centrifuga a 12,000 x g durante 10 min a 4 °C hasta 25 °C. El sobrenadante se desecha, y el sedimento de ARN se lava dos veces con 1 ml de etanol al 70 %, con centrifugación a 7,500 x g durante 10 min a 4 °C hasta 25 °C entre lavados. El etanol se

desecha, y el sedimento se seca brevemente al aire durante 3 a 5 min, antes de resuspenderlo en 50 µl de agua libre de nucleasas.

El ARN total se cuantifica con el uso del NANODROP8000® (THERMO-FISHER) y las muestras se normalizan a 5 µg/10 µl. Después, se agrega 10 µl de glioxal (AMBION/INVITROGEN) a cada una de las muestras. De cinco a 14 ng de mezcla de marcadores estándares de ARN DIG (ROCHE APPLIED SCIENCE, Indianápolis, IN) se dispensan y se agregan a un volumen igual de glioxal. Las muestras y los ARN marcadores se desnaturalizan a 50 °C durante 45 min y se almacenan en hielo hasta su aplicación en un gel de agarosa SEAKEMGOLD (LONZA, Allendale, NJ) al 1.25 % en tampón de corrida de glioxal NORTHERNMAX 10 X (AMBION/INVITROGEN). Los ARN se separan mediante electroforesis a 65 voltios/30 mA durante 2 h y 15 min.

Después de la electroforesis, el gel se enjuaga en SSC 2X durante 5 min, y se adquiere una imagen de este en una estación GEL DOC (BIORAD, Hercules, CA), después, el ARN se transfiere pasivamente a una membrana de nailon (MILLIPORE) durante la noche a RT, con el uso de SSC 10X como tampón de transferencia (SSC 20X consiste en 3 M de cloruro de sodio y 300 mM de citrato trisódico, pH 7.0). Después de la transferencia, la membrana se enjuaga en SSC 2X durante 5 minutos, el ARN se reticula por UV a la membrana (AGILENT/STRATAGENE), y la membrana se deja secar a temperatura ambiente hasta 2 días.

La membrana se prehibrida en tampón ULTRAHYB™ (AMBION/INVITROGEN) durante 1 a 2 h.

La sonda consiste en un producto amplificado por PCR que contiene la secuencia de interés, (por ejemplo, la porción de secuencia antisentido de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5-8, 87, 103, o 104, según corresponda) marcada 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. Después de la hibridación, la membrana de transferencia se somete a lavados con DIG, se envuelve, se expone a una

película durante 1 a 30 minutos, después la película se revela, todo mediante los métodos recomendados por el proveedor del estuche DIG.

Determinación del número de copias del transgén. Se recolectan piezas de hojas de maíz que equivalen aproximadamente a 2 perforaciones de hoja en placas de recolección de 96 pocillos (QIAGEN). La ruptura del tejido se realiza con un pulverizador de tejidos KLECKO™ (GARCIA MANUFACTURING, Visalia, CA) en tampón de lisis BIOSPRINT96 AP1 (suministrado con un estuche BIOSPRINT96 PLANT KIT; QIAGEN) con una perla de acero inoxidable. Después de la maceración del tejido, el ADN_g se aísla en un formato de alto rendimiento con el uso de un estuche BIOSPRINT96 PLANT KIT y un robot de extracción BIOSPRINT96. El ADN_g se diluye 1:3 de ADN:agua antes de configurar la reacción de qPCR.

Análisis por qPCR. La detección del transgén mediante ensayo de sonda de hidrólisis se realiza mediante PCR en tiempo real con el uso de un sistema LIGHTCYCLER®480. Los oligonucleótidos que se usarán en los ensayos de sonda de hidrólisis para detectar el gen objetivo (por ejemplo, *spt5*), la secuencia enlazadora (por ejemplo, el bucle), y/o para detectar una porción del gen de SpecR (es decir, el gen de resistencia a la espectinomicina contenido en los plásmidos vectores binarios; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:67; oligonucleótidos SPC1 en la **Tabla 9**), se diseñan con el uso del software LIGHTCYCLER® PROBE DESIGN 2.0. Además, los oligonucleótidos que se usarán en los ensayos de sonda de hidrólisis para detectar un segmento del gen *AAD-1* de tolerancia a herbicidas (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:68; oligonucleótidos GAAD1 en la **Tabla 9**) se diseñan con el uso del software PRIMER EXPRESS (APPLIED BIOSYSTEMS). La **Tabla 9** muestra las secuencias de los cebadores y sondas. Los ensayos se realizan en formato múltiple con reactivos para un gen cromosómico endógeno de maíz (invertasa (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:69; núm. de acceso de GENBANK: U16123; referido en la presente invención como IVR1), que sirve como una secuencia de referencia interna para asegurar que el ADN_g esté presente en cada uno de los ensayos. Para la amplificación, la mezcla maestra LIGHTCYCLER®480 PROBES (ROCHE APPLIED SCIENCE)

se prepara a una concentración final de 1x en una reacción múltiple en volumen de 10 µl 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 etapas tal como se describió en la **Tabla 11**. La activación del fluoróforo y la emisión de las sondas marcadas con FAM y HEX son como se describió anteriormente; los conjugados a CY5 se excitan a lo máximo a 650 nm y fluorescen a lo máximo a 670 nm.

Las puntuaciones de Cp (el punto en el cual la señal de fluorescencia cruza el umbral de fondo) se determinan a partir de los datos de PCR en tiempo real con el uso del 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 tal como se describió previamente (anteriormente; en qPCR de ARN).

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

Nombre	Secuencia
GAAD1-F	TGTTCTGGTTCCTCTACCAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:70)
GAAD1-R	CAACATCCATCACCTTGACTGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:71)
GAAD1-P (FAM)	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:72)
IVR1-F	TGGCGGACGACGACTTGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:73)
IVR1-R	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:74)
IVR1-P (HEX)	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:75)
SPC1A	CTTAGCTGGATAACGCCAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:76)
SPC1S	GACCGTAAGGCTTGATGAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77)
TQSPEC (CY5*)	CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78)

Loop_F	GGAACGAGCTGCTTGCAT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:82)
Loop_R	CACGGTGCAGCTGATTGATG(SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83)
Loop_FAM	TCCCTTCCGTAGTCAGAG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:84)

5 *CY5 = Cianina-5

Tabla 10. Componentes de la reacción para el análisis del número de copias génicas y detección de la estructura principal del plásmido.

Componente	Cant. (µl)	Reserva	Conc. final
Tampón 2x	5.0	2x	1x
Cebador Directo Apropriado	0.4	10 µM	0.4
Cebador Inverso Apropriado	0.4	10 µM	0.4
Sonda Apropriada	0.4	5 µM	0.2
IVR1-Cebador Directo	0.4	10 µM	0.4
IVR1-Cebador Inverso	0.4	10 µM	0.4
IVR1-Sonda	0.4	5 µM	0.2
H ₂ O	0.6	NA*	NA
ADNg	2.0	ND**	ND
Total	10.0		

*NA = No Aplicable

**ND = No Determinada

Tabla 11. Condiciones del termociclador para qPCR de ADN.

Análisis del número de copias genómicas			
Proceso	Temp.	Tiempo	núm. de Ciclos
Activación Objetivo	95 °C	10 min	1
Desnaturalización	95 °C	10 s	40
Extensión & Adquisición de FAM, HEX, o CY5	60 °C	40 s	
Enfriamiento	40 °C	10 s	1

EJEMPLO 8: Bioensayo de maíz transgénico

10 Bioensayo con insectos. La bioactividad del ARNdh de la presente invención producido en células vegetales se demuestra por medio de los métodos de bioensayo. Ver, por ejemplo, Baum *et al.* (2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-1326. La eficacia puede demostrarse, por ejemplo, mediante la alimentación de los insectos objetivos con varios tejidos vegetales o piezas de tejido derivados de una planta que produce un ARNdh insecticida en un ambiente de

15 alimentación controlado. De manera alternativa, se preparan extractos a partir de varios tejidos vegetales derivados de una planta que produce el ARNdh insecticida, y los ácidos nucleicos extraídos se dispensan en la parte superior de las dietas artificiales para los bioensayos tal como se describió anteriormente en la presente invención. Los resultados de dichos ensayos de alimentación se comparan con bioensayos realizados de manera similar que usan tejidos de

20 control apropiados 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 prueba se reduce en comparación con aquellos del grupo de control.

Bioensayos con insectos con eventos de maíz transgénico. Se seleccionan dos larvas del gusano de la raíz del maíz occidental (1 a 3 días de edad) que eclosionaron de huevos lavados

25 y se colocan en cada uno de los pocillos de la bandeja de bioensayo. Después, los pocillos se cubren con una cubierta de lengüeta del tipo Pull'Peel™ (BIO-CV-16, BIO-SERV) y se colocan

en una incubadora a 28 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 18 h/6 h. Nueve días después de la infestación inicial, se evalúa la mortalidad de las larvas, que se calcula como el porcentaje de insectos muertos de la cantidad total de insectos en cada uno de los tratamientos. Las muestras de insectos se congelan a -20 °C durante dos días, después, las larvas de insectos de cada uno de los tratamientos se agrupan y se pesan. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calcula como el peso promedio de los tratamientos experimentales dividido entre la media del peso promedio de dos tratamientos de pocillos de control. Los datos se expresan como un porcentaje de inhibición del crecimiento (de los controles negativos). Los pesos promedios que sobrepasan el peso promedio del control se normalizan a cero.

Bioensayos con 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 de suelo, se colocan en una solución de agar al 0.15 %, y la concentración se ajusta a aproximadamente 75 a 100 huevos por alícuota de 0.25 ml. Una placa de eclosión se configura en una placa Petri con una alícuota de suspensión de huevos para monitorear las tasas de eclosión. El suelo alrededor de las plantas de maíz cultivadas en ROOTRANERS® se infesta con 150 a 200 huevos de WCR. Se permite que los insectos se alimenten durante 2 semanas, después de ese tiempo se otorga una “clasificación de la raíz” a cada una de las plantas. Una escala de lesión de nodos se utiliza para la calificación, esencialmente de acuerdo con Oleson *et al.* (2005) J. Econ. Entomol. 98:1-8. Las plantas que superan este bioensayo, que muestran lesión reducida, se trasplantan a macetas de 5 galones para la producción de semillas. Los trasplantes se tratan con insecticida para prevenir el daño adicional causado por el gusano de la raíz así como la liberación de los insectos en los invernaderos. 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 de control negativo transgénicas se generan por transformación con vectores que albergan 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 a partir de las cuales se produjeron las plantas transgénicas. Los bioensayos se
5 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 de 10 a 20 plantas transgénicas T₀ de *Zea mays* tal como se describió en el EJEMPLO 6. Se obtienen de 10 a 20 líneas T₁ adicionales de *Zea mays* independientes que
10 expresan el ARNdh de horquilla para un constructo de iARN para la prueba de reto del gusano de la raíz del maíz. El ARNdh de horquilla comprende una porción de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3, y/o la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:101. Los ARNdh de horquilla adicionales se derivan, por ejemplo, de secuencias de plagas de coleópteros tales como, por ejemplo, Caf1-180 (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU.
15 núm. 2012/0174258), VatpaseC (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2012/0174259), Rho1 (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2012/0174260), VatpaseH (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2012/0198586), PPI-87B (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2013/0091600), RPA70 (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2013/0091601), RPS6 (Publicación de Solicitud de
20 Patente de EE.UU. núm. 2013/0097730), *ROP* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 14/577,811), *ARN polimerasa II140* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 14/577,854), *Dre4* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 14/705,807), *ncm* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm.62/095487), *COPI alfa* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/063,199), *COPI beta* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/063,203), *COPI gamma* (Solicitud de Patente de
25 EE.UU. núm. 62/063,192), o *COPI delta* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/063,216), *ARN polimerasa II* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/133,214), *ARN polimerasa II-215*

(Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/133,202), *ARN polimerasa 33* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/133,210), y *spt6* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/168606). Estas se confirman a través de RT-PCR u otros métodos de análisis molecular.

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

Además, las moléculas de iARN que tienen secuencias con discrepancias con más de 80 % de
15 identidad de secuencias respecto a los genes objetivo afectan a los gusanos de la raíz del maíz en una manera similar a la observada con las moléculas de iARN que tienen 100 % de identidad de secuencias respecto a los genes objetivo. El apareamiento de la secuencia con discrepancias con las secuencias nativas para formar un ARNdh de horquilla en el mismo constructo de iARN administra ARNip procesados en plantas capaces de afectar el crecimiento,
20 el desarrollo, y la viabilidad de las plagas de coleópteros que se alimentan de ellas.

La administración *in planta* de ARNdh, ARNip o miARN correspondientes a genes objetivo y la posterior captación por parte de las plagas de coleópteros a través de la alimentación resulta en la regulación negativa de los genes objetivo en la plaga de coleópteros a través de silenciamiento génico mediado por ARN. Cuando la función de un gen objetivo es importante
25 para una o más etapas del desarrollo, el crecimiento y/o el desarrollo de la plaga de coleópteros se afecta, y en el caso de al menos uno de WCR, NCR, SCR, MCR, *D. balteata* LeConte, *D.*

speciosa Germar, *D. u. tenella*, y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim, conduce a que la plaga no pueda infestar, alimentarse, y/o desarrollarse exitosamente, o conduce a la muerte de la plaga de coleópteros. La elección de los genes objetivo y el éxito de la aplicación de la iARN se usa entonces para el control de plagas de coleópteros.

- 5 Comparación fenotípica de las líneas transgénicas de iARN y *Zea mays* no transformado. Los genes o secuencias objetivo de plagas de coleópteros seleccionados para crear el ARNd_h de horquilla no tienen similitud con ninguna secuencia de genes vegetales conocida. Por consiguiente, 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 tenga algún efecto
- 10 nocivo sobre las 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 de líneas transgénicas transformadas con un vector “vacío” que no tiene un gen que exprese una horquilla. Se comparan las características de las raíces, los brotes, el follaje y la reproducción de las plantas. No hay diferencia observable en la longitud de las raíces
- 15 y los patrones de crecimiento de las plantas transgénicas y no transformadas. Se registran las características de los brotes de las plantas, tales como la altura, las cantidades y tamaños de las hojas, el tiempo de floración, el tamaño y apariencia de las flores. En general, no hay diferencias morfológicas observables entre las líneas transgénicas y aquellas sin expresión de moléculas de ARNi objetivo cuando se cultivan *in vitro* y en el suelo en el invernadero.

20

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

- Una planta transgénica de *Zea mays* que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe a una molécula de ARNi dirigida a un organismo que no pertenece
- 25 a una plaga de coleópteros se transforma secundariamente mediante las 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 la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3). Los vectores plasmídicos de transformación de plantas preparados esencialmente tal como se describió en el EJEMPLO 4 se administran mediante métodos de transformación mediados por *Agrobacterium* o WHISKERS™ en células de maíz en suspensión o embriones de maíz inmaduros obtenidos de una planta transgénica de *Zea mays* Hi II o B104 que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe a una molécula de ARNi dirigida a un organismo que no pertenece a una plaga de coleópteros.

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

Una planta transgénica de *Zea mays* que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe a una molécula de ARNi dirigida a un organismo de una plaga de coleópteros (por ejemplo, al menos una molécula de ARNdh que incluye una molécula de ARNdh dirigido a un gen que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y/o la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3) se transforma secundariamente mediante las metodologías de *Agrobacterium* o WHISKERS™ (ver Petolino y Arnold (2009) Methods Mol. Biol. 526:59-67) para producir una o más moléculas de proteína insecticida, por ejemplo, las proteínas insecticidas Cry3, Cry34, Cry35, Cry11, Cry2A, Cry3, Cry7A, Cry8, Cry9D, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43, Cry55, Cyt1A, y Cyt2C. Los vectores plasmídicos de transformación de plantas preparados esencialmente tal como se describió en el EJEMPLO 4 se administran mediante métodos de transformación mediados por *Agrobacterium* o WHISKERS™ en células de maíz en suspensión o embriones de maíz inmaduros obtenidos de una planta transgénica de *Zea mays* B104 que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe a una molécula de ARNi dirigida a un organismo de

una plaga de coleópteros. Se obtienen plantas doblemente transformadas que producen moléculas de ARNi y proteínas insecticidas para el control de plagas de coleópteros.

Ejemplo 12: Cribado de genes objetivo candidatos en chinche café neotropical

5 (*Euschistus heros*)

Colonia de chinche café neotropical (BSB: *Euschistus heros*). Las BSB se criaron en una incubadora a 27 °C, a 65 % de humedad relativa, con un ciclo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Se sembró un gramo de huevos recolectados durante 2-3 días en recipientes de 5 L con discos de papel de filtro en el fondo, y los recipientes se cubrieron con una malla #18 para la ventilación. Cada recipiente de cría produjo aproximadamente 300-400 BSB adultos. En todas las etapas, los insectos se alimentaron con ejotes frescos tres veces por semana, una bolsita de mezcla de semillas que contenía semillas de girasol, frijoles de soja, y maníes (relación en peso 3:1:1) se reemplazó una vez a la semana. El agua se proporcionó en frascos con tapones de algodón como mechas. Después de las dos semanas iniciales, los insectos se transfirieron a un nuevo recipiente una vez a la semana.

Dieta artificial de BSB. Se preparó una dieta artificial de la siguiente manera. Los ejotes liofilizados se mezclaron hasta obtener un polvo fino en un mezclador MAGIC BULLET®, mientras que los maníes crudos (orgánicos) se mezclaron en un mezclador MAGIC BULLET® separado. Los ingredientes secos mezclados se combinaron (porcentajes en peso: ejotes, 35 %; maníes, 35 %; sacarosa, 5 %; complejo vitamínico (por ejemplo, mezclas de vitaminas para insectos Vanderzant, SIGMA-ALDRICH, núm. de Catálogo V1007), 0.9 %); en un gran mezclador MAGIC BULLET®, que se tapó y se agitó bien para mezclar los ingredientes. Los ingredientes secos mezclados se agregaron después a un tazón de mezcla. En un recipiente separado, se mezclaron bien agua y agente antifúngico de benomilo (50 ppm; 25 µl de una solución a 20,000 ppm /50 ml de solución de dieta), y después se agregaron a la mezcla de ingredientes secos. Todos los ingredientes se mezclaron manualmente hasta que la solución se

mezcló completamente. La dieta se conformó en tamaños deseados, se envolvió con holgura en papel de aluminio, se calentó durante 4 horas a 60 °C, y después se enfrió y se almacenó a 4 °C. la dieta artificial se usó dentro de dos semanas de preparación.

Ensamble de transcriptomas de BSB. Se seleccionaron seis etapas del desarrollo de BSB para

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

Identificación de ortólogos de *spt5* de BSB. Se realizó una búsqueda por tBLASTn del transcriptoma agrupado de BSB con el uso como consulta, de la isoforma A de la proteína *spt5* de *Drosophila* (núm. de acceso de GENBANK NP_652610). El gen *spt5-1* de BSB (SEC. CON

20 NÚM. DE IDENT.:85), se identificó como un gen *spt5* objetivo candidato de *Euschistus heros*, cuyo producto tiene la secuencia peptídica predicha; SEC. CON NÚM. DE IDENT.:86.

Preparación de plantillas y síntesis de ARNdH. El ADNc se preparó a partir de ARN total de BSB extraído de un solo insecto adulto joven (aproximadamente 90 mg) con el uso del reactivo TRIzol® (LIFE TECHNOLOGIES). El insecto se homogeneizó a temperatura ambiente en un

25 tubo de microcentrífuga de 1.5 ml con 200 µl de TRIzol® con el uso de una mano de mortero para sedimentos (FISHERBRAND núm. de Catálogo 12-141-363) y un mezclador de motor con

mano de mortero (COLE-PARMER, Vernon Hills, IL). Después de la homogeneización, se agregaron 800 µl de TRIzol® adicionales, el homogeneizado se agitó por vórtice, y después se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos. Los residuos celulares se retiraron mediante centrifugación y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. De acuerdo con el protocolo de extracción con TRIzol® recomendado por el fabricante para 1 ml de TRIzol®, el sedimento de ARN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 200 µl de tampón Tris de un estuche GFX PCR DNA and GEL EXTRACTION KIT (Illustra™; GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES) con el uso de tampón de elución tipo 4 (es decir 10 mM de Tris-HCl; pH 8.0). La concentración de ARN se determinó con el uso de un espectrofotómetro NANODROP™ 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE)

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

Los cebadores que se muestran en la **Tabla 12** se usaron para amplificar BSB_*spt5-1 reg1*, BSB_*spt5-2 reg1*, y BSB_*spt5-3 reg1*. La plantilla de ADN se amplificó por “PCR touchdown” (reducción de la temperatura de hibridación de 60 °C a 50 °C, en una disminución de 1 °C/ciclo) con 1 µl de ADNc (mencionado anteriormente) como la plantilla. Un fragmento que comprende un segmento de 496 pb de *reg1* de BSB_*spt5-1* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87), se generó durante 35 ciclos de PCR. El procedimiento anterior también se usó para amplificar una plantilla de *YFPv2* de control negativo de 301 pb (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:90), con el uso de los cebadores *YFPv2-F* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:91) y *YFPv2-R* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:92). Los cebadores de BSB_*spt5-1 reg1* y *YFPv2* contenían una secuencia promotora de fago T7 (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9) en sus extremos 5', y de este modo permitieron el uso de los fragmentos de ADN de *YFPv2* y BSB_*spt5* para la transcripción de ARNdh.

Tabla 12. Cebadores y pares de cebadores usados para amplificar porciones de regiones codificantes de genes objetivo *spt5* ilustrativos y un gen *YFP* de control negativo.

	ID del Gen	ID del Cebador	Secuencia
Par 20	reg1 de <i>spt5</i> - 1	BSB_spt5- 1_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCTTTTGAACA CCTTCCCCTACATC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:88)
		BSB_spt5- 1_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCATTTGATACT ATAACAGGAATAAAG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:89)
Par 21	YFP	YFPv2-F	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCATCTGGAGC ACTTCTCTTTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:91)
		YFPv2-R	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCATCTCCTTCA AAGGTGATTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:92)

Síntesis de ARNdh. El ARNdh se sintetizó con el uso de 2 µl de producto de PCR (mencionado anteriormente) como plantilla con un estuche MEGAscript™ T7 RNAi kit (AMBION) usado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Ver la **Figura 1**. El ARNdh se cuantificó en un espectrofotómetro NANODROP™ 8000, y se diluyó a 500 ng/µl en tampón TE 0.1X libre de nucleasas (1 mM de Tris HCL, 0.1 mM de EDTA, pH 7.4).

Inyección de ARNdh en hemocoel de BSB. Las BSB se criaron con una dieta de ejotes y semillas, al igual que la colonia, en una incubadora a 27 °C y a 65 % de humedad relativa y un fotoperíodo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Las ninfas de segundo estadio (cada una con un peso de 1 a 1.5 mg) se manipularon con cuidado con un cepillo pequeño para prevenir lesiones, y se colocaron en una placa Petri sobre hielo para enfriar e inmovilizar los insectos. Cada insecto se inyectó con 55.2 nl de solución de ARNdh a 500 ng/µl (es decir, 27.6 ng de ARNdh;

dosis de 18.4 a 27.6 µg/g de peso corporal). Las inyecciones se realizaron con el uso de un inyector NANOJECT™ II (DRUMMOND SCIENTIFIC, Broomhall, PA), equipado con una aguja de inyección extraída de un capilar de vidrio Drummond #3-000-203-G/X de 3.5 pulgadas. La punta de la aguja se rompió, y el capilar se volvió a llenar con aceite mineral ligero y después se
5 llenó con 2 a 3 µl 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 contienen una torta de dieta artificial para BSB, y se cubrieron con cubiertas de lengüeta Pull-N-Peel™ (BIO-CV-4; BIO-SERV). La humedad se
10 suministró por medio de 1.25 ml de agua en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml con una mecha de algodón. Las bandejas se incubaron a 26.5 °C, 60 % de humedad, y un fotoperíodo de 16:8 horas de luz:oscuridad. Los conteos de viabilidad y los pesos se tomaron en el día 7 después de las inyecciones.

El gen *spt5* de BSB es un objetivo de ARNdh letal. Como se resume en la **Tabla 13**, en cada
15 réplica, al menos diez ninfas de BSB de 2do. estadio (1 – 1.5 mg cada una) se inyectaron en el hemocoel con 55.2 nl de ARNdh de reg1 de BSB_*spt5*-1 (500 ng/µl), para una concentración final aproximada de 18.4 – 27.6 µg de ARNdh/g de insecto. La mortalidad determinada para ARNdh de reg1 de BSB_*spt5*-1 fue mayor que la observada con la misma cantidad de ARNdh de *YFPv2* inyectada (control negativo).

Tabla 13. Resultados de la inyección de ARNdh de *spt5* de BSB en el hemocoel de ninfas de la chinche café neotropical de 2do. estadio siete días después de la inyección.

Tratamiento*	N Ensayos	Media del % de Mortalidad ± SEM**	Valor p de la prueba t
BSB <i>spt5-1 reg1</i>	3	37 ± 12	5.57E-02
No inyectado	3	0 ± 0	3.74E-01
YFPv2	3	3 ± 3.3	

*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 albergan vectores de expresión para ácidos nucleicos que comprenden cualquier porción de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85 (por ejemplo, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87) tal como se describió en el

EJEMPLO 4. Se obtienen 10-20 líneas T₁ adicionales de *Zea mays* independientes que expresan el ARNdh de horquilla para un constructo de iARN para la prueba de reto de BSB. Se obtienen ARNdh de horquilla que comprenden una porción de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 85 o segmentos de esta (por ejemplo, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87). Estas se confirman mediante RT-PCR u otros métodos de análisis molecular. Las preparaciones de ARN total de

las líneas T₁ independientes seleccionadas se usan opcionalmente para la RT-PCR con cebadores diseñados para unirse en el enlazador 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 usan opcionalmente para amplificar y confirmar la producción del ARNm preprocesado requerido para la producción de ARNip *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión del ARN de horquilla en cada planta transgénica de *Zea mays*. Opcionalmente, el procesamiento de la horquilla de ARNdh de

los genes objetivo a ARNip se confirma posteriormente en líneas transgénicas independientes con el uso de hibridaciones con membrana de transferencia de ARN.

Además, las moléculas de iARN que tienen secuencias con discrepancias con más de 80% de identidad de secuencias respecto a los genes objetivo afectan a los hemípteros de manera similar a la observada con moléculas de iARN que tienen 100 % de identidad de secuencias respecto a los genes objetivo. El apareamiento de la secuencia con discrepancias con secuencias nativas para formar un ARNdh de horquilla en el mismo constructo de iARN administra ARNip procesados en plantas capaces de afectar el crecimiento, el desarrollo y la viabilidad de las plagas de hemípteros que se alimentan de ellas.

La administración *in planta* de ARNdh, ARNip, ARNhp, ARNh, o miARN correspondientes a genes objetivo y la posterior captación por parte de las plagas de hemípteros a través de la alimentación resulta en la regulación negativa de los genes objetivo en la plaga de hemípteros a través del silenciamiento génico mediado por ARN. Cuando la función de un gen objetivo es importante en una o más etapas del desarrollo, el crecimiento, el desarrollo y/o la supervivencia de la plaga de hemípteros se afecta 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*, conduce a que la plaga 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 el éxito de la aplicación de la iARN se usan entonces para el control de plagas de hemípteros.

Comparación fenotípica de las líneas transgénicas de iARN y *Zea mays* no transformado. Los genes o secuencias objetivo de plagas de hemípteros seleccionados para crear ARNdh de horquilla no tienen similitud con ninguna secuencia de genes vegetales conocida. Por consiguiente, 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 tenga algún efecto nocivo sobre las 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 tiene un gen que exprese una horquilla. Se comparan las características de las raíces, los brotes, el follaje y la reproducción de las plantas. No hay diferencia observable en la longitud de las raíces y los patrones de crecimiento de las plantas transgénicas y las no transformadas. Las características de los brotes de las plantas tales como la altura, las cantidades y tamaños de las hojas, el tiempo de floración, el tamaño y apariencia de las flores son similares. En general, no hay diferencias morfológicas observables entre las líneas transgénicas y aquellas sin expresión de moléculas de ARNi objetivo cuando se cultivan *in vitro* y en el suelo en el invernadero.

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

Se generan de diez a 20 plantas transgénicas T₀ de *Glycine max* que albergan vectores de expresión para ácidos nucleicos que comprenden una porción de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85 o segmentos de esta (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87) tal como se conoce en la técnica, que incluye por ejemplo, la transformación mediada por *Agrobacterium*, tal como se describe a continuación. Las semillas de soja maduras (*Glycine max*) se esterilizan durante la noche con gas de cloro durante dieciséis horas. Después de la esterilización con gas de cloro, las semillas se colocan en un recipiente abierto en una campana de flujo LAMINAR™ para disipar el gas de cloro. A continuación, las semillas esterilizadas se embeben con H₂O estéril durante dieciséis horas en la oscuridad con el uso de una caja negra a 24 °C.

Preparación de frijoles de soja de semilla partida. La semilla de soja partida que comprende una porción de un protocolo de eje embrionario requiere la preparación del material de semilla de soja que se corta en dirección longitudinal, con el uso de una cuchilla #10 fijada a un escalpelo,

a lo largo del hilo de la semilla para separar y retirar la cubierta de la semilla, y para partir la semilla en las dos secciones del cotiledón. Debe prestarse especial atención de retirar parcialmente el eje embrionario, en donde aproximadamente 1/2 – 1/3 del eje embrionario permanece unido al extremo nodal del cotiledón.

- 5 Inoculación. Las semillas de soja partidas que comprenden una porción parcial del eje embrionario se sumergen después durante aproximadamente 30 minutos en una solución de *Agrobacterium tumefaciens* (por ejemplo, la cepa EHA 101 o EHA 105) que contiene un plásmido binario que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85 y/o segmentos de esta (por ejemplo, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87). La solución de *A. tumefaciens* se diluye hasta una
- 10 concentración final de $\lambda=0.6$ OD₆₅₀ antes de sumergir los cotiledones que comprenden el eje embrionario.

Cocultivo. Después de la inoculación, la semilla de soja partida se deja cocultivar con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* durante 5 días en un medio de cocultivo (*Agrobacterium* Protocols, vol. 2, 2^{da} Ed., Wang, K. (Ed). Humana Press, Nueva Jersey, 2006) en una placa Petri cubierta

15 con una pieza de papel de filtro.

Inducción de brotes. Después de 5 días de cocultivo, las semillas de soja partidas se lavan en medio de inducción de brotes (SI) líquido que consiste en sales B5, vitaminas B5, 28 mg/l de hierro, 38 mg/l de Na₂EDTA, 30 g/l de sacarosa, 0.6 g/l de MES, 1.11 mg/l de BAP, 100 mg/l de TIMENTINTM, 200 mg/l de cefotaxima, y 50 mg/l de vancomicina (pH 5.7). Las semillas de soja

20 partidas se cultivan después en medio de inducción de brotes I (SI I) que consiste en sales B5, vitaminas B5, 7 g/l de agar noble, 28 mg/l de hierro, 38 mg/l de Na₂EDTA, 30 g/l de sacarosa, 0.6 g/l de MES, 1.11 mg/l de BAP, 50 mg/l de TIMENTINTM, 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. Después de 2 semanas de cultivo, los explantes de la semilla

25 de soja partida transformada se transfieren a medio de inducción de brotes II (SI II) que contiene medio SI I complementado con 6 mg/l de glufosinato (LIBERTY[®]).

Elongación de los brotes. Después de 2 semanas de cultivo en el medio SI II, los cotiledones se retiran de los explantes y una almohadilla lisa de brote que contiene el eje embrionario se extirpa al realizar un corte en la base del cotiledón. La almohadilla de brote aislada del cotiledón se transfiere a medio de elongación de brotes (SE). El medio SE consiste en sales MS, 28 mg/l de hierro, 38 mg/l de Na₂EDTA, 30 g/l de sacarosa y 0.6 g/l de MES, 50 mg/l de asparagina, 100 mg/l de ácido L-pirolutámico, 0.1 mg/l de IAA, 0.5 mg/l de GA3, 1 mg/l de ribósido de zeatina, 50 mg/l de TIMENTINTM, 200 mg/l de cefotaxima, 50 mg/l de vancomicina, 6 mg/l de glufosinato, 7 g/l de agar noble, (pH 5.7). Los cultivos se transfieren a medio SE fresco cada 2 semanas. Los cultivos se cultivan en una cámara de cultivo CONVIRONTM a 24 °C con un fotoperíodo de 18 h a una intensidad de luz de 80 a 90 µmol/m²sec.

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 de brote del cotiledón, e inmersión del brote elongado en 1 mg/l de IBA (ácido indol 3-butírico) durante 1 a 3 minutos para promover el enraizamiento. A continuación, los brotes elongados se transfieren a medio de enraizamiento (sales MS, vitaminas B5, 28 mg/l de hierro, 38 mg/l de Na₂EDTA, 20 g/l de sacarosa y 0.59 g/l de MES, 50 mg/l de asparagina, 100 mg/l de ácido L-pirolutámico 7 g/l de agar noble, pH 5.6) en bandejas Phytatray.

Cultivo. Después del cultivo en una cámara de cultivo CONVIRONTM a 24 °C, fotoperíodo de 18 h, durante 1 a 2 semanas, los brotes que han desarrollado raíces se transfieren a una mezcla de suelo en una copa de helados cubierta y se colocan en una cámara de cultivo CONVIRONTM (modelos CMP4030 y CMP3244, Controlled Enviroments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) bajo condiciones de día prolongado (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a una intensidad de luz de 120 a 150 µmol/m²sec bajo temperatura (22 °C) y humedad (40-50 %) constantes para la aclimatación de las plántulas. Las plántulas enraizadas se aclimatan en copas de helados durante varias semanas antes de transferirlas al invernadero para su aclimatación adicional y el establecimiento de plantas transgénicas de soja robustas.

Se obtienen de 10 a 20 líneas T₁ adicionales de *Glycine max* independientes que expresan el ARNdh de horquilla para un constructo de ARNi para la prueba de reto del BSB. Puede obtenerse un ARNdh de horquilla que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 85 o segmentos de esta (por ejemplo, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:87). Estas se confirman a través de RT-PCR u otros métodos de análisis molecular como se conoce en la técnica. Las preparaciones de ARN total de las líneas T₁ independientes seleccionadas se usan opcionalmente para RT-PCR con cebadores diseñados para unirse en el enlazador del casete de expresión de la horquilla en cada uno de los constructos de iARN. Además, los cebadores específicos para cada gen objetivo en un constructo de iARN se usan opcionalmente para amplificar y confirmar la producción del ARNm preprocesado requerido para la producción del ARNip *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión del ARN de horquilla en cada planta transgénica de *Glycine max*. Opcionalmente, el procesamiento de la horquilla del ARNdh de los genes objetivo a ARNip se confirma posteriormente en líneas transgénicas independientes con el uso de hibridaciones con membrana de transferencia de ARN.

Las moléculas de iARN que tienen secuencias con discrepancias con más de 80 % de identidad de secuencias respecto a los genes objetivo afectan a la BSB en una manera similar a la observada con las moléculas de iARN que tienen 100 % de identidad de secuencias respecto a los genes objetivo. El apareamiento de la secuencia con discrepancias con secuencias nativas para formar un ARNdh de horquilla en el mismo constructo de iARN administra ARNip procesados en plantas capaces de afectar el crecimiento, el desarrollo, y la viabilidad de las plagas de hemípteros que se alimentan de ellas.

La administración *in planta* de ARNdh, ARNip, ARNhp, o miARN correspondientes a genes objetivo y la posterior captación por parte de las plagas de hemípteros a través de la alimentación resulta en la regulación negativa de los genes objetivo en la plaga de hemípteros a través del silenciamiento génico mediado por ARN. Cuando la función de un gen objetivo es

importante para una o más etapas del desarrollo, el crecimiento, el desarrollo, y la viabilidad de la alimentación de la plaga de hemípteros se afecta, 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 meditabunda*, *Thyanta perditor*,
5 *Chinavia marginatum*, *Horcias nobilellus*, *Taedia stigmosa*, *Dysdercus peruvianus*, *Neomegalotomus parvus*, *Leptoglossus zonatus*, *Niesthrea sidae*, y *Lygus lineolaris* conduce a que la plaga no pueda infestar, alimentarse, y/o desarrollarse exitosamente, o conduce a la muerte de la plaga de hemípteros. La elección de los genes objetivo y el éxito de la aplicación de la iARN se usan entonces para el control de plagas de hemípteros.

- 10 Comparación fenotípica de las líneas transgénicas de iARN y *Glycine max* no transformada. Los genes o secuencias objetivo de plagas de hemípteros seleccionados para crear el ARNdh de horquilla no tienen similitud con ninguna secuencia de genes vegetales conocida. Por consiguiente no se espera que la producción o la activación de la iARN (sistémica) mediante constructos dirigidos a estos genes o secuencias de plagas de hemípteros tenga algún efecto
15 nocivo sobre las 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 de líneas transgénicas transformadas con un vector “vacío” que no tiene un gen que exprese una horquilla. Se comparan las características de las raíces, los brotes, el follaje y la reproducción de las plantas. No hay diferencia observable en la longitud de las raíces
20 y los patrones de crecimiento de las plantas transgénicas y las no transformadas. Las características de los brotes de la planta tales como la altura, las cantidades y tamaños de las hojas, el tiempo de floración, el tamaño y apariencia de las flores son similares. En general, no hay diferencias morfológicas observables entre las líneas transgénicas y aquellas sin expresión de las moléculas de ARNi objetivo cuando se cultivan *in vitro* y en el suelo en el invernadero.

EJEMPLO 15: Bioensayos con *E. heros* con una dieta artificial.

En los ensayos de alimentación de ARNdh con una dieta artificial, las bandejas de 32 pocillos se preparan con una torta de dieta artificial de ~18 mg y agua, al igual que en los experimentos de inyección (Ver EJEMPLO 12). Se agrega ARNdh a una concentración de 200 ng/μl a la muestra de torta alimenticia y agua; 100 μl a cada uno de dos pocillos. Cinco ninfas de *E. heros* de 2do estadio se introducen en cada uno de los pocillos. Las muestras de agua y ARNdh dirigido a un transcrito de *YFP* se usan como controles negativos. Los experimentos se repiten en tres días diferentes. Los insectos supervivientes se pesan, y las tasas de mortalidad se determinan después de 8 días de tratamiento. Se observa mortalidad y/o inhibición del crecimiento en los pocillos provistos con ARNdh de *spt5* de BSB, en comparación con los pocillos de control.

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

Se generan vectores de transformación de *Arabidopsis* que contienen un constructo de gen objetivo para la formación de horquilla que comprende segmentos de *spt5* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85) con el uso de métodos moleculares estándares similares al EJEMPLO 4. La transformación de *Arabidopsis* se realiza con el uso del procedimiento estándar basado en *Agrobacterium*. Las semillas T₁ se seleccionan con el marcador de selección de tolerancia al glufosinato. Se generan plantas transgénicas T₁ de *Arabidopsis* y se generan plantas transgénicas T₂ homocigotas de copia única para los estudios con insectos. Los bioensayos se realizan en plantas de *Arabidopsis* en cultivo con inflorescencias. Se colocan de cinco a diez insectos en cada una de las plantas y se monitorean para determinar la supervivencia dentro de 14 días.

Construcción de vectores de transformación de *Arabidopsis*. Los clones de entrada basados en un vector de entrada que alberga un constructo de gen objetivo para la formación de horquilla

que comprenden un segmento de *spt5* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:85) se ensamblan con el uso de una combinación de fragmentos sintetizados químicamente (DNA2.0, Menlo Park, CA) y métodos de clonación molecular estándar. La formación de horquilla intramolecular en transcritos primarios de ARN se facilita mediante la disposición (dentro de una sola unidad de transcripción) de dos copias de un segmento del gen objetivo en orientaciones opuestas, en donde los dos segmentos se separan por una secuencia enlazadora. Por consiguiente, el transcrito primario de ARNm contiene las dos secuencias de segmentos del gen *spt5* como grandes repeticiones invertidas entre sí, separadas por la secuencia enlazadora. Una copia de un promotor (por ejemplo, promotor de ubiquitina 10 de *Arabidopsis thaliana* (Callis et al. (1990) J. Biological Chem. 265:12486-12493)) se usa para activar la producción del transcrito primario de ARNm de horquilla, y un fragmento que comprende una región no traducida 3' del marco abierto de lectura 23 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3' UTR v1; patente de EE.UU. 5,428,147) se usa para terminar la transcripción del gen que expresa el ARN de horquilla.

Los clones de horquilla dentro de los vectores de entrada se usan en reacciones de recombinación GATEWAY® estándares con un vector de destino binario típico para producir los vectores de transformación para 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 EE.UU. núm. 2011/0107455), bajo la regulación de un promotor del virus del mosaico de la nervadura de la yuca (promotor CsVMV v2, Patente de EE.UU. 7,601,885; Verdaguer et al. (1996) Plant Mol. Biol. 31:1129-39). Un fragmento que comprende una región no traducida 3' del marco abierto de lectura 1 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3' UTR v6; Huang et al. (1990) J. Bacteriol. 172:1814-22) se usa 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 GATEWAY®

estándares 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* (tal como se indicó anteriormente) y un fragmento que comprende una región no traducida 3' del ORF23 de *Agrobacterium tumefaciens* (tal como se
5 indicó 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 la cepa *Agrobacterium* GV3101 (pMP90RK). Los clones recombinantes de *Agrobacterium* se confirman mediante análisis de restricción de
10 preparaciones de plásmidos de las colonias recombinantes de *Agrobacterium*. Se usa un estuche Qiagen Plasmid Max Kit (Qiagen, núm. de Catálogo 12162) para extraer los plásmidos de los cultivos de *Agrobacterium* de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante.

Transformación de *Arabidopsis* y selección de T₁.

Se cultivan de doce a quince plantas de *Arabidopsis* (c.v. Columbia) en macetas de 4" en el invernadero con intensidad de luz de 250
15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 25 °C, y condiciones de 18:6 horas de luz:oscuridad. Los tallos de las flores primarias se recortan una semana antes de la transformación. Los inóculos de *Agrobacterium* se preparan mediante la incubación de 10 μl de reserva en glicerol de *Agrobacterium* recombinante en 100 ml de caldo LB (Sigma L3022) +100 mg/l de espectinomicina + 50 mg/l de kanamicina a 28 °C y agitación a 225 rpm durante 72 horas. Las células de *Agrobacterium* se recolectan y se
20 suspenden en solución de sacarosa al 5 % + Silwet-L77 al 0.04 % (Lehle Seeds núm. de Catálogo VIS-02) +10 $\mu\text{g}/\text{l}$ de benzamino purina (BA) a OD₆₀₀ 0.8~1.0 antes de la inmersión floral. Las partes de la planta sobre el suelo se sumergen en la solución de *Agrobacterium* durante 5-10 minutos, con agitación moderada. Las plantas se transfieren después al invernadero para el cultivo normal con riego regular y fertilización hasta la producción de
25 semillas.

EJEMPLO 17: Crecimiento y bioensayos de *Arabidopsis* transgénica

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

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

Generación de semillas T₂ de *Arabidopsis* y bioensayos de T₂. Las semillas T₂ se producen a partir de eventos de bajo número de copias seleccionados (1-2 inserciones) para cada constructo. Las plantas (homocigotas y/o heterocigotas) se someten a un bioensayo de alimentación de *E. heros*, tal como se describió anteriormente. Las semillas T₃ se recolectan de las homocigotas y se almacenan para el análisis futuro.

EJEMPLO 18: Transformación de especies de cultivo adicionales

El algodón se transforma con un transgén de ARNdh de *spt5* para proporcionar el control de insectos 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 EE.UU. 7,838,733, o el Ejemplo 12 de la Publicación de Patente Internacional PCT núm. WO 2007/053482.

Ejemplo 19: ARNdh de *spt5* en el manejo de insectos

Los transgenes de ARNdh de *spt5* se combinan con otras moléculas de ARNdh en las plantas transgénicas para proporcionar efectos de iARN sinérgicos y direccionamiento de la iARN redundante. Las plantas transgénicas que incluyen, por ejemplo y sin limitación, maíz que expresa ARNdh dirigido a *spt5* son útiles para prevenir el daño causado por la alimentación de insectos coleópteros y hemípteros. Los transgenes de ARNdh de *spt5* también se combinan en plantas con tecnología de proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*, y/o polipéptidos insecticidas PIP-1, para representar nuevos modos de acción en pirámides de genes para el manejo de la resistencia de los insectos. Cuando se combinan con otras moléculas de ARNdh dirigidas a plagas de insectos y/o con proteínas insecticidas en plantas transgénicas, se observa un efecto insecticida sinérgico que también mitiga el desarrollo de poblaciones de insectos resistentes.

Ejemplo 20: Transcriptoma del escarabajo del polen

Insectos: Se recolectaron larvas y adultos del escarabajo del polen en campos de plantas de colza en floración (Giessen, Alemania). Los escarabajos adultos jóvenes (cada uno por grupo de tratamiento: n = 20; 3 réplicas) se retaron mediante la inyección de una mezcla de dos bacterias diferentes (*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*), una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y LPS bacteriano. Los cultivos bacterianos se cultivaron a 37 °C con agitación, y la densidad óptica se monitoreó a 600 nm (OD600). Las células se recolectaron a OD600 ~1 por centrifugación y se resuspendieron en solución salina regulada con fosfato. La mezcla se introdujo ventrolateralmente por punción en el abdomen del escarabajo del polen con el uso de una aguja de disección sumergida en una solución acuosa de 10 mg/ml de LPS (endotoxina de *E. coli* purificada; Sigma, Taufkirchen, Alemania) y los cultivos de levaduras y de bacterias. Junto con los escarabajos de la prueba de reto inmunológico se recolectaron los escarabajos sin tratamiento y las larvas (n = 20 y 3 réplicas cada uno) en el mismo punto de tiempo.

Aislamiento de ARN: El ARN total se extrajo 8 h después de la inmunización a partir de escarabajos y larvas congelados con el uso de TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, EE.UU.) y se purificó con el uso del estuche RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) en cada caso de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se verificó con el uso de un Bioanalizador Agilent 2100 y un estuche RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). La cantidad de ARN se determinó con el uso de un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. El ARN se extrajo individualmente de cada uno de los grupos de tratamiento de adultos inmunoaducidos, grupos de adultos de control, y grupos de larvas y posteriormente se combinaron cantidades iguales de ARN total en un grupo por muestra (adultos con reto inmunológico, adultos de control y larvas) para la secuenciación.

Información del transcriptoma: La generación de datos de la secuenciación de ARN y el ensamble de las lecturas únicas de fragmentos de 100 pb obtenidas por la secuenciación de

ARN se llevó a cabo por separado en 5 µg de ARN total aislado a partir de escarabajos adultos con reto inmunológico, escarabajos adultos sin tratamiento (control) y larvas no tratadas. La secuenciación se llevó a cabo en Eurofins MWG Operon con el uso de la plataforma Illumina HiSeq-2000. Esta produjo 20.8 millones de lecturas para la muestra de escarabajos adultos de control, 21.5 millones de lecturas para la muestra de escarabajos adultos con reto de LPS y 25.1 millones de lecturas para la muestra de larvas. Las lecturas agrupadas (67.5 millones) se ensamblaron con el uso del software de ensamble de *Velvet/Oases* (M.H. Schulz et al. (2012) *Bioinformatics*. 28:1086-92; Zerbino & E. Birney (2008) *Genome Research*. 18:821-9). El transcriptoma contenía 55,648 secuencias.

Identificación del gen *spt5* del escarabajo del polen. Se usó una búsqueda por tBLASTn del transcriptoma para identificar los cóntigos coincidentes. Como consulta, se usó la secuencia peptídica del *spt5* de *Tribolium castaneum* (GenBank XP_971098.1).

Ejemplo 21: Mortalidad del escarabajo del polen después del tratamiento con ARNi de *spt5*

Se usaron cebadores específicos de genes que incluyen la secuencia promotora de la polimerasa T7 en el extremo 5' para crear productos de PCR de aproximadamente 500 pb mediante PCR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 103). Los fragmentos de PCR se clonaron en el vector pGEM-T Easy de acuerdo con el protocolo del fabricante y se verificaron mediante secuenciación. El ARNd_h se produjo después mediante ARN polimerasa T7 (MEGAscript® RNAi Kit, Applied Biosystems) a partir de un constructo de PCR generado a partir del plásmido secuenciado de acuerdo con el protocolo del fabricante.

La inyección de ~100 nl de ARNd_h (1 ug/ul) en escarabajos adultos se realizó con un micromanipulador en un estereomicroscopio de disección (n=10; 3 réplicas biológicas). Los animales se anestesiaron sobre hielo antes de fijarlos a la cinta de doble adherencia. Los controles recibieron el mismo volumen de agua. El ARNd_h de IMPI (ge inhibidor de metaloproteinasa de insectos del lepidóptero *Galleria mellonella*) se procesó como control

negativo. Todos los controles en todas las etapas no pudieron someterse a prueba debido a la carencia de animales.

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

5 **Tabla 14.** Resultados de la inyección de adultos de *M.aeneus* con ARNdh de *spt5* (porcentaje de supervivencia media $\pm$ estándar, n=3 grupos de 10)

Tratamiento	% de Supervivencia media $\pm$ SD*				
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
<i>spt5</i>	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	87 $\pm$ 15	60 $\pm$ 10
control	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	93 $\pm$ 6	80 $\pm$ 10	80 $\pm$ 10
	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16	
<i>spt5</i>	50 $\pm$ 20	37 $\pm$ 12	27 $\pm$ 12	20 $\pm$ 0	
control	80 $\pm$ 10	77 $\pm$ 15	63 $\pm$ 15	63 $\pm$ 15	

15 *Desviación estándar

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

25

Tabla 15. Resultados de la alimentación de adultos de *M. aneneus* con ARNdh de *spt5* (porcentaje de supervivencia media $\pm$ estándar, n= 3 grupos de 10)

Tratamiento	% de Supervivencia media $\pm$ SD*				
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
<i>spt5</i>	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	97 $\pm$ 6	93 $\pm$ 6
control	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	90 $\pm$ 10	87 $\pm$ 12
Tratamiento	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16	
<i>spt5</i>	63 $\pm$ 32	57 $\pm$ 40	47 $\pm$ 46	40 $\pm$ 44	
control	87 $\pm$ 12	87 $\pm$ 12	87 $\pm$ 12	87 $\pm$ 12	

*Desviación estándar

Tabla 16. Resultados de la alimentación de adultos de *M. aneneus* con ARNdh de *spt5* (porcentaje de supervivencia media $\pm$ estándar, n= 3 grupos de 10)

Tratamiento	% de Supervivencia media $\pm$ SD*				
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
<i>spt5</i>	100 $\pm$ 0	93 $\pm$ 6	93 $\pm$ 6	93 $\pm$ 6	93 $\pm$ 6
Control	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	97 $\pm$ 6	97 $\pm$ 6	97 $\pm$ 6
Tratamiento	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16	
<i>spt5</i>	90 $\pm$ 0	87 $\pm$ 6	87 $\pm$ 6	80 $\pm$ 17	
Control	97 $\pm$ 6	90 $\pm$ 0	90 $\pm$ 0	90 $\pm$ 0	

* Desviación estándar

EJEMPLO 21: Transformación de hipocótilos de canola mediada por *Agrobacterium*

Preparación de *Agrobacterium*

La cepa de *Agrobacterium* que contiene el plásmido binario se siembra por estrías en placas de medio YEP (Bacto Peptone™ 20.0 g/l y extracto de levadura 10.0 g/l) que contienen

estreptomicina (100 mg/ml) y espectinomicina (50 mg/ml) y se incuba durante 2 días a 28 °C. La cepa de *Agrobacterium* propagada que contiene el plásmido binario se raspa de la placa estriada de 2 días con el uso de un asa de inoculación estéril. La cepa de *Agrobacterium* raspada que contiene el plásmido binario se inocula después en 150 ml de medio YEP líquido
5 modificado con estreptomicina (100 mg/ml) y espectinomicina (50 mg/ml) en matraces de 500 ml estériles con deflectores y se agita a 200 rpm a 28 °C. Los cultivos se centrifugan y se resuspenden en medio M (sales de LS, glucosa al 3 %, vitaminas B5 modificadas, 1 µM de cinetina, 1 µM de 2,4-D, pH 5.8) y se diluyen hasta la densidad apropiada (50 unidades Klett tal como se mide con el uso de un espectrofotómetro) antes de la transformación de los hipocótilos
10 de canola.

Transformación de canola

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

Pretratamiento: En el día 5, se escinden asépticamente segmentos de hipocótilo de
20 aproximadamente 3 mm de longitud, las secciones restantes de raíces y brotes se desechan (el secado de segmentos de hipocótilo se previene mediante la inmersión de los segmentos de hipocótilo en 10 ml de agua milliQ™ estéril durante el proceso de escisión). Los segmentos de hipocótilo se colocan horizontalmente sobre papel de filtro estéril en medio de inducción de callos, MSK1D1 (MS, 1 mg/l de cinetina, 1 mg/l de 2,4-D, sacarosa al 3.0 %, Phytagar al 0.7 %)
25 para el tratamiento previo de 3 días en una cámara de cultivo Percival™ con régimen de cultivo a 22-23 °C y un fotoperíodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad.

Cocultivo con Agrobacterium: El día antes del cocultivo con *Agrobacterium*, se inoculan matraces de medio YEP que contiene los antibióticos apropiados, con la cepa de *Agrobacterium* que contiene el plásmido binario. Los segmentos de hipocótilo se transfieren desde el medio de inducción de callos en papel de filtro, MSK1D1 a un placa Petri™ vacía de 100 x 25 mm que contiene 10 ml de medio M líquido para prevenir que los segmentos de hipocótilo se sequen. En esta etapa se usa una espátula para remover los segmentos y transferir los segmentos a medio nuevo. El medio M líquido se retira con una pipeta y se agregan 40 ml de suspensión de *Agrobacterium* a la placa Petri™ (500 segmentos con 40 ml de solución de *Agrobacterium*). Los segmentos de hipocótilo se tratan durante 30 minutos con movimiento de agitación periódica de la placa Petri™ para que los segmentos de hipocótilo permanezcan inmersos en la solución de *Agrobacterium*. Al final del período de tratamiento, la solución de *Agrobacterium* se transfiere con pipeta a un vaso de precipitados para residuos; se esteriliza en autoclave y se desecha (la solución de *Agrobacterium* se retira completamente para prevenir la proliferación de *Agrobacterium*). Los hipocótilos tratados se transfieren con pinzas a las placas originales que contienen medio MSK1D1 cubierto con papel de filtro (debe tenerse cuidado para asegurarse de que los segmentos no se sequen). Los segmentos de hipocótilo transformados y los segmentos de hipocótilo de control no transformados se vuelven a colocar en la cámara de cultivo Percival™ bajo intensidad de luz reducida (cubriendo las placas con papel de aluminio), y los segmentos de hipocótilo tratados se cocultivan con *Agrobacterium* durante 3 días.

Inducción de callos en medio de selección: Después de 3 días de cocultivo, los segmentos de hipocótilo se transfieren individualmente con pinzas a medio de inducción de callos, MSK1D1H1 (MS, 1 mg/l de cinetina, 1 mg/l de 2,4-D, 0.5 g/l de MES, 5 mg/l de AgNO₃, 300 mg/l de Timentin™, 200 mg/l de carbenicilina, 1 mg/l de Herbiace™, sacarosa al 3 %, Phytagar al 0.7 %) con régimen de cultivo a 22-26 °C. Los segmentos de hipocótilo están anclados en el medio pero no están profundamente embebidos en el medio.

Selección y regeneración de brotes: Después de 7 días en medio de inducción de callos, los segmentos de hipocótilo con formación de callos se transfieren a medio de regeneración de brotes 1 con selección, MSB3Z1H1 (MS, 3 mg/l de BAP, 1 mg/l de zeatina, 0.5 g/l de MES, 5 mg/l de AgNO₃, 300 mg/l de Timentin™, 200 mg/l de carbenicilina, 1 mg/l de Herbiace™, sacarosa al 3 %, Phytagar al 0.7 %). Después de 14 días, los segmentos de hipocótilo que desarrollan brotes se transfieren a medio de regeneración 2 con mayor selección, MSB3Z1H3 (MS, 3 mg/l de BAP 1 mg/l de zeatina, 0.5 g/l de MES, 5 mg/l de AgNO₃, 300 mg/l de Timentin™, 200 mg/l de carbenicilina, 3 mg/l de Herbiace™, sacarosa al 3 %, Phytagar al 0.7 %) con régimen de cultivo a 22-26 °C.

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

Inducción de raíces: Después de 14 días de cultivo en medio de elongación de brotes, los brotes aislados se transfieren a medio MSMEST (MS, 0.5 g/l de MES, 300 mg/l de Timentin™, sacarosa al 2 %, TC agar al 0.7 %) para la inducción de raíces a 22-26 °C. Los brotes que no producen raíces después de la incubación en la primera transferencia al medio MSMEST se transfieren a una segunda o tercera ronda de incubación en medio MSMEST hasta que los brotes desarrollen raíces.

Aunque la presente descripción puede ser susceptible a diversas modificaciones y formas alternativas, las modalidades específicas se han descrito a modo de ejemplo y en forma detallada en la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que la presente descripción

no pretende limitarse a las formas particulares descritas. En lugar de esto, la presente descripción abarca todas las modificaciones, equivalentes, y alternativas que se encuentren dentro del alcance de la presente invención de acuerdo a lo definido en las reivindicaciones adjuntas siguientes y sus equivalentes legales.