

MOLÉCULAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE SPT6 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. núm. 62/168,606, presentada el 29 de mayo de 2015, para “spt6 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). 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 polinucleótidos codificantes y no codificantes
- 15 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 en
- 25 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.

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 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 la 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.

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 los y granos del maíz en las puntas de las espigas expuestas. Si los 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 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

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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.

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 resultan 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 el 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 pasajero 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 Argonauta, 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 ARNip y/o miARN en algunos eucariotas tales como plantas, nemátodos, y algunos insectos.

Solamente los transcritos complementarios al ARNip y/o al miARN se escinden y se degradan, y

5 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
10 DICER1 facilita la degradación dirigida por miARN mediante Argonauta1. Lee *et al.* (2004) Cell 117(1):69-81. DICER2 facilita la degradación dirigida por ARNip mediante Argonauta2.

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.

15 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
20 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
25 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 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 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 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 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 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.

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; y *D. speciosa* Germar. 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 factor de elongación de la transcripción referido en la presente invención como, por ejemplo, *spt6*, o un homólogo de *spt6* 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 *spt6-1* de *Diabrotica virgifera* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1). 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; y/o fragmentos de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3-5).

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 *spt6*). 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 (SPT6-1 de *Diabrotica*), y/o una secuencia de aminoácidos dentro de un producto de *spt6-1* de *Diabrotica*.

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 *spt6*. 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 *spt6* (por ejemplo, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1).

Además se describen medios *spt6* para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros, así como medios *spt6* para proporcionar protección a una planta contra plagas de coleópteros. Un medio *spt6* 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.:81-84; y los complementos de este. Los equivalentes funcionales de los medios *spt6* 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 *spt6* de coleóptero que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4, y/o la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5. Un medio *spt6* para proporcionar protección a una planta contra plagas de coleópteros es una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un medio *spt6* 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.

Se describen métodos para controlar una población de una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de coleópteros), que comprenden proporcionar a una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de coleópteros) 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 donde la molécula de ARNi comprende la totalidad o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:82; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:82; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:84; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:84; un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido de *spt6* nativo de un insecto (por ejemplo, *WCR*); el complemento de un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido de *spt6* nativo de un insecto; 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 y 3-5; el complemento de un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y 3-5.

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 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.:4; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; 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 y 3-5; el complemento un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende la totalidad o parte de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y 3-5.

- 5 En la presente invención también se describen métodos en donde los ARNdh, ARNip, ARNhp, 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 ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN y/o ARNh. En estos y otros ejemplos adicionales, los ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y/o ARNh pueden ingerirse por la plaga. La ingestión de los ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y/o
- 10 ARNh de la invención puede 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
- 15 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*, y *D. u. undecimpunctata*.

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

20 que se adjuntan.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

5 Las secuencias de ácidos nucleicos que se relacionan en el listado de secuencias adjunto se 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

10 secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos listadas también define un género de 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

15 la secuencia de referencia. Se entenderá además que una secuencia de aminoácidos 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

20 necesariamente mediante la secuencia primaria, la secuencia complementaria y la 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

25 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 *spt6* de WCR
5 ilustrativo, referido en la presente invención en algunos casos como *spt6* de WCR o *spt6-1* de WCR:

GTCAC TTGTCAATTGTCAACCTGGAAAACGACTTGTCTGAAGTCGCATAGTTTTTATAAGTTTAA
ATAAACTAAATTAAATATAAATACTTCGAGAATGCAATAATTATTATTCTTTAACTAGACCCACA
GCTTATTAATTAGCAGAAGTAGTAGCAGACTTATACTAACTAGCATAAGGAGAAACATATTAAC
10 ATAACATGGCAGACTTCATAGATTCTGAAGCAGAAGAAAGTAGTGAGGAGGAGGAATTAGAT
CATAGGGATCGTAAAAAAGCCCAAAAAGCCAAAGTTGTAGATAGTTCAGATGAAGATGATGAA
GATGATGACGAAAGACTGAGAGAGGAATTAAGGATTTGATTGATGATAATCCTATTGAAGAA
AGTGATGCTGAGTCTGATGCTTCAGGAAGGGAAAAACGTAAGAAATCTGACGACGAGGATTT
GGATGATCGACTGGAAGATGAAGATTATGATTTGCTTGAAGAAAATTTGGGTGTTAAAGTTGA
15 AAGAAGGAAATTCAAGCGACTGCGGCGTTTTGAAGATGAAGAAAGTGAAGGAGAAGAAGAAC
ATGATCCTGAACAAGATAGGGAACAAATTGCTATGGATATATTTTCAGATGATGACGATGAAA
GACGATCAGAACGAAGTCACAGACCTGCCGTCTGAACAAGAACTTATGGTGTAGGCGAGGAA
GAAGAGGAAGGGGAGTACTCGGATGCCGATGATTTTATAGTTGACGATGACGGTAGACCGAT
AGCTGAAAAGAAGAAGAAGAAAAACCAATATTTACTGATGCCGCTCTCCAAGAGGCTCAAGA
20 AACCTTCGGTGTCTGATTTTGATTATGATGAATTTAGTAAATACGATGAAGATGATTACGAAGAT
GAAGAGGAGGAGGATGACGAATACGAGGAAGATGATGTAGAGAAAAGGAAACGGCCTAAAA
AGACTTCAAAGAAAAAACCGACGAAGAAATCCATTTTTGAAGTGTATGAACCTAGTGAAC TTAA
AAGAGGGTTCTTTACCGATCTCGATAATGAAATCCGAAACACTGATATTCCCGAAAGAATGCA
ACTTCGTGATGTTCCAATCACCGCTGTTCCGGATGACTCAACTGAACTTGATGATGAAGCAGA
25 ATGGATTTACAGGCAAGCGTTTTGTAACAGAACTGTTTCCAATGTGGATTCTCATTTATCATCA

GAGGCAAGAGAGAAATTAAGAAGACTCATCATGCCATCGGAAAAATCAGAAAAGCATTAGAT
 TTTATAAGAAATCAACAATTAGAAGTACCGTTTATTGCTTTTTATAGAAAGGAGTATGTTCAACC
 GGAACCTTAATATTAACGATTTGTGGAAAGTATATAAATACGATGCAAAGTGGTGCCAATTGAAA
 ACACGCAAAGAAAACCTCTTGAAGCTTTTTGAAAAAATGAGGTCATATCAAACCTGACCACATAA
 5 TGAAAGATCCAGATGCACCAATTCCAGACAACCTTCGTATTATGACTGAGTCCGACATTGAGC
 GATTGAAAAATGTTCAAACCGCCGAAGAGTTAAATGACGTTTACAATCATTTTCATTTTATATTA
 TGCTGCAGATTTGCCAGCCATGCATGCCGCGTGGAGAGTCAAAGAAAGAGAAAGGAGAAGA
 CAGGAAAGAAAGGAGGCTAGACTTAAGCTCATCGCTGAAAGTGAAGAAGGTGCTGAAATTCC
 TGAAGAGCCTGAGGAAATTGACGATGATGAACCAGAAGCTGAAACCTTAAATACGCCAATA
 10 GATCAGGCAGCTATGCACTATGTAATAAAGGAGGTTTGGGTCCTCTAGCGAAGAAATTTGGTT
 TAACGCCTGAAGAATTTGCCGAAAACCTGAGAGATAATTATCAGAGGCACGAAGTAGATCAA
 GAACATATAGAACCTGTAGAAGTCGCTAAAGAATTTCGTATCGCCGAAATTTCTACAGTGGAA
 GAAGTGTTGCAAGCTACTAAACACATGGTAGCTTTACAAATAGCAAGAGAACCATTAGTAAGG
 AAATGCGTAAGAGAAATTTTCTTTGAACGAGCTAGATTAAACGTTTATCCAACCAAAAAGGGT
 15 GTGAAAGTTATAGATGAAGCTCATAATTGCTATAGTATGAAGTATGTAAAAAATAAACCAGTAA
 GAGATCTTGCAGGCGACCAATTTTTAAAATTATGTTTAGCCGAAGAGGAGAACCTCCTTACTA
 TTACCATCAATGACCATATTCAAGGAAACACTACTAACAATTACATTGATGAAGTCAAACAATT
 ATATATAAAGGATGAATTCAGCAAACACGTTTCAGGATTGGAATGCGCTAAGAATGGAATCGGT
 AGAAAGGGCTTTAACGAAAAGTGTCTTACCAGATTTAAGATCTGAATTAACGAACGTTGCT
 20 CACAGAGGCTAAAGAATTCGTATTAAGCTTGCTGTAGAAAATTATATAATTGGATAAAGATT
 GCTCCATACGCAATAACTTTTCCCGATGAAGACGAAGATGATTGGGATACATCAAAGGTGTT
 AGAACTATGGGTGTAGCATACGTACCAGAGCACACAGTATCAGCTTTTACCTGTATTTTCAGCA
 CCAGACGGAGATATAACTGATTATCTCAGATTACCAAATATTCTAAAAAGAAAAAATAGCTTTC
 GAACTGAAGAAAACTTATGAAGGAAGCTGATCTTCAAGCACTGAAAAATTCATATTCCTTAA
 25 AAAGCCTCATGTGATAGCAGTAGGGGGTGAGTCCAGAGAAGCCTTAATGATCGCTGATGATA

TCAGAGGAGTAATAAGTGAAC TAATAAGAATCCGACCAATTCCCACAGATTAGGGTTGAAATTA
 TTGATAATGAATTAGCCAAAGTGTACGCAAATTCCATTAAAGGTTCAACTGATTTTCAGAGATTA
 TCCAGAGTTGTTAAGGCAAGCTATTTTCATTAGCTCGAAGAATGCAAGATCCTTTGGTTGAATTT
 TCCCAATTATGTAATAGCGATGAGGAAATTTTGAGTCTGAGGTTTCATCCCTTGCAGGAACAA
 5 GTCCAGAAAGAAGAACTACTAGAAGCTCTCTGTTTAGAATTTGTCAACAGAACAAATGAAGTA
 GGTGTAGATATAAATCTTGCCGTTTCAGCAGATTCATAAAAGTAGTTTAGTTCAATTCATATGCG
 GTCTAGGACCGCGTAAAGGTCAAGCGTTACTTAAAGTTCTGAAACAACTAATCAGAGGCTTG
 AAAACAGAACCCAATTGGTTACATTTTGTCATATGGGTCCAAAAGTTTTTTATTAATTGTTCTGG
 ATTCATAAAGATTGATACCAATAGTTTAGGAGACAGTACTGAGGCATATGTTGAAATATTGGAT
 10 GGCTCTCGAGTTCATCCCGAACTTATGAATGGGCACGAAAAATGGCTGTGGATGCTTTAGA
 ATATGACGATGATGAGGGAGCTAATCCGGCGGGAGCTTTAGAGGAAATTCTCGAGGCGCCA
 GAGAGGTTAAAAGATCTTGACTTGGATGCATTTGCGGAGGAATTGGAAAGACAAGGATTTGG
 TAACAAGAGTATAACATTGTATGACATTAGAGCAGAACTGAACTCGCGATATAAAGATTTGAG
 ACAACCTTTTCGTTCTGCAAATCCTGAAGAACTATTCGATATGCTTACTAAAGAACTCCCGAA
 15 ACATTTTATATTGGAAAAATGGTTACATCTACCGTGTTTGGCATTGCAAGGAGAAAACCAAAGT
 CAGACCAGCTCGATCAAGCTAATCCGGTCCGTAATGACGAACTGGTTTGTGGCAGTGCCCC
 TTCTGTTTGAAAAATGATTTTCCTGAATTATCTGATGTATGGAATCATTTTGATGCAGGAGCAT
 GTCCTGGTCAAGCTACTGGAGTTAACTAAGACTGGATAATGGTATATTAGGTTATATTTATAT
 AAAAAATATAAGCGACAAACCAGTTGCTAATCCGGAAGAAAGAGTAGGCATAGGACAATTAAT
 20 TCACTGTAGAATAATAAAAATTGACGTAGAGAAGTTTAGTGTTGATTGTACATCGAAATCTAGC
 GATCTTGCTGATAAAAATCATGAATGGAGACCTCAACGAGATCCTCATTATGATCAAGAACGT
 GAAGACAAAGACAATCGATTAGAAGCCGAGAAGAAGAAAGAGAAACAGCGTATGACGTACAT
 CAAGAGGGTTATCGTTCATCCGGCGTTCCATAACATATCCTATGCCGAAGCCGAAAAATGTAT
 GGTTAATATGGACCAGGGTGAAGTTATCATTAGGCCTTCGAGTAAGGGTGCGGATCATTTGA
 25 CCATTACTTGGAAGGTTACGGATGGAATCTATCAACACATTGATATTAAGGAACAAGGGAAAG

TTAACGCTTTTTCTTTAGGAAAATCATTATGGATTGGAAATGAAGAATTTGAAGATCTTGATGA
 AATAATAGCTAGGCACGTTACACCAATGGCGGCGCATGCTAGAGATTTACTGTATTTTAGGTA
 TTACAAAGATTTCCAAGGTGGTCATAAAGATAAGGCTGAGGAATATCTAAAAGATGAAAAAA
 GAAAAATGCTTCTAAAATTCATTATGTAGTTAGTGCTGCTAAGAATATACCTGGTAAATTTCTTC
 5 TTTTCGTACCTTCCACGCAACAAAGTTAGACACGAATATGTAACAGTTACTCCAGAAGGCTTTC
 GGTTTAGACAACAAATGTTTGATTCCGTTTCTTCGTTATTTAAATGGTTCAAAGAACATTTCCG
 GGAGCCTCCACCAGGCGGTGCAACACCAGGTAGCACGCCAAGGATGGCTTCAAGCAGAACT
 GGATATGGAAGTGCCACACCCGCGTATAGTATGAATAATGAAGCTATTCAAAGAGTTGCTCAA
 AATTTACCAAGTCATGTAGTTCAAGCGTTATCTGCTGCCACCAACCAAACCTCCACATTATCCC
 10 CACACCCCTGGTTATGGAGGCAATTATATTAATACGCCTTACACTCCAAGTGGTCAAACCTCCA
 TACATGACTCCGTACGCTACACCCCATACGCAGCAAACCTCCCCGCTATGGTCATCAAACACC
 TTCCCAACACATGGCGAGCTCAGCACCACAAGGTCTCAACAATCCCTTTTTACATCCTGGCG
 CGGTGACTCCCTCCCAACGAACTCCTATTTATCGCAACCATCCTGCACAATCTCCAGTAATGC
 TTCCTACAAGCCCTGTACCAAGTCCAGGTTCCCAGAGTTCATACAGTAGTCATTTAAGTCATA
 15 ATCAGCGAAGTGGAAGTTATGCTGAATCCTTAAGATTCCAACCTCCCGAATCGCCGAGAAGC
 TCAGTGAGTAATAGAAGCTTTCAAACCTGATAGATACGGCGGTGATAGGTATGGTAAAGGAGG
 AAGTCATAGATATGGTGGAAGCTCAAACGAAGATAGATATGGTAAGGGAGGAGGAGGAAATG
 AAAATACGGATTGGCAGAAAGCTGCAGAAGCATGGGCTCGATCTAGATCTACTCCGAGAAGT
 GATGGCCGTAATACTCCAAGATCTGTAGGTCAACGAACTCCTAGATACGACAACGACGCCGA
 20 ACGTTCTAGAATGAAACACCTCAGCAAGAGCCCGAGGTCTGTTAGGTCTACTCCTCGAACCA
 ATACATCTCCACATTCTATGTCCCTAGGTGATGCTACCCCTCTGTATGACGAAAGTATCTAAAT
 TACTTTGTATTTGGTTATATAGTAGGGTAACAGTGATATTGTAAATGCTAAAATCAACAATACA
 GATTCGCGATATTAAGTCACAATGACGACCTCTCGTGGAGTTCGGTGAAACTAACTTTGAGG
 GCGTTTTCACTGTCAAACGTCCAGCGCACATGCACCTGAAACAAGTAGGCAATATTCATTATT

TATTTTTACAGGTTTTTTATACAAATATTATTTACAACATAGACTTCAACTTTTACTGAAAGGTG
AAGCTTTCATATTAATAATTTT

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido SPT6
5 codificado por un ADN de *spt6* de WCR ilustrativo, también referido en la presente invención en
algunos casos como SPT6 de WCR o SPT6-1 de WCR:

MADFIDSEAEESSEEEELDHRDRKKAQKAKVVDSSDEDEDDDERLREELKDLIDDNPIEESDAE
SDASGREKRKKSDDDEDLDDRLEDEDYDLLEENLGVKVERRKFKRLRRFEDEESEGEEEHDPEQD
REQUIAMDIFSDDDDERRSERSHRPAVEQETYGVGEEEEEGEYSADDDFIVDDDGRPIAEKKKKKK
10 PIFTDAALQEAQETFGVDFDYDEF SKYDEDDYEDEEEEDDEYEEDDVEKRKRPKKTSKKKPTKKS
IFEVYEPSELKRGFFTDLDNEIRNTDIPERMQLRDVPITAVPDDSTELDDEAEWIYRQAF CNRTVSN
VDSHLSSEAREKLKKTTHAIGKIRKALDFIRNQQLEVPIAFYRKEYVQPELNINDLWKVYKYDAKW
CQLKTRKENLLKLF EKMSYQTDHIMKDPDAPIPDNLRIMTESDIERLKNVQTAEELNDVHNHFILY
YAADLPAMHAAWRVKERERRRQERKEARLKLIAESEEGAEIPEEPEEIDDDPEAEATLKYANRSG
15 SYALCNKGGLGPLAKKFGLTPEEFAENLRDNYQRHEVDQEHI EPVEVAKEFVSPKFPTVEEVLQA
TKHMVALQIAREPLVRKCVREIFFERARLNVYPTKKGVKVIDEAHNCYSMKYVKNKPVRDLAGDQ
FLKLCLAEENLLTITINDHIQGNNTNNYIDEVKQLYIKDEF SKHVQDWNALRMESVERALTKSVLP
DLRSELKRTLLTEAKEFVLKACCRKLYNWKIAPYAITFPDEDEDDWDTSKGVRTMGVAYVPEHTV
SAFTCISAPDGDITDYLRLPNILKRKNSFRTEEKLMKEADLQALKNFIFLKKPHVIAVGGESREALMI
20 ADDIRGVISELIESDQFPQIRVEIIDNELAKVYANSIKGSTDFRDYPELLRQAISLARRMQDPLVEFS
QLCNSDEEILSLRFHPLQEQQKEELLEALCLEFVNRTNEVGVDINLAVQQIHKSSLVQFICGLGPR
KGQALLKVLKQTNQRLENRTQLVTFCHMGPKVFINCSGFIKIDTNSLGDSTEAYVEILDGSRVHPE
TYEWARDMAVDALEYDDDEGANPAGALEEILEAPERLKDLDLDAFAEELERQGF GNKSITLYDIRA
ELNSRYKDLRQPFRSANPEELFDMLTKETPETFYIGKMTSTVFGIARRKPKSDQLDQANPVRND
25 ETGLWQCPFCLKNDFPELSDVWNHFDAGACPGQATGVKLRLDNGILGYIYIKNISDKPVANPEER

VGIGQLIHCRIKIDVEKFSVDCTSKSSDLADKNHEWRPQRDPHYDQEREDKDNRLAEKKKEKQ
 RMTYIKRVIVHPAFHNISYAEAEKCMVNMDQGEVIIRPSSKGADHLTITWKVTDGIYQHIDIKEQGK
 VNAFSLGKSLWIGNEEFEDLDEIARHVTPMAAHARDLLYFRYYKDFQGGHKDKAE EYLKDEKKK
 NASKIHYVVSAAKNIPGKFLLSYLPRNKVRHEYVTVTPEGFRFRQQMFDSVSSLFKWFKEHFREP
 5 PPGGATPGSTPRMASSRTGYGSATPAYSMNNEAIQRVAQNLPSHV VQALSAATNQTPHYPHTP
 GYGGNYINTPYTPSGQTPYMTPTYATPHTQQTPRYGHQTPSQHMASSAPQGLNNPFLHPGAVTP
 SQRTPIYRNHPAQSPVMLPTSPVPSPGSQSSYSSHL SHNQ RSGSYAESLRFQPPESPRSSVSNR
 SFQTD RYGGDRY GKG GSHRYGGSSNEDRYGKGGGGNENTDWQKAAEAWARSRSTPRSDGR
 NTPRSVGQRTPRYDND AERSRMKHL SKSPRSVRSTPRTNTSPHSMSLG DATPLYDESI

10

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3 muestra un ADN de *spt6* de WCR ilustrativo, referido en la presente invención en algunos casos como reg1 (región 1) de *spt6-1* de WCR, usado en algunos ejemplos para la producción de ARNdh:

CGCCTTACACTCCAAGTGGTCAA ACTCCATACATGACTCCGTACGCTACACCCCATACGCAG
 15 CAAACTCCCCGCTATGGTCATCAAACACCTTCCCAACACATGGCGAGCTCAGCACCACAAGG
 TCTCAACAATCCCTTTTTACATCCTGGCGCGGTGACTCCCTCCCAACGAACTCCTATTTATCG
 CAACCATCCTGCACAATCTCCAGTAATGCTTCCTACAAGCCCTGTACCAAGTCCAGGTTCCCA
 GAGTTCATACAGTAGTCATTTAAGTCATAATCAGCGAAGTGGAAGTTATGCTGAATCCTTAAG
 ATTCCAACCTCCCGAATCGCCGAGAAGCTCAGTGAGTAATAGAAGCTTTCAA ACTGATAGATA
 20 CGGCGGTGATAGGTATGGTAAAGGAGGAAGTCATAGATATGGTGGAAGCTCAAACGAAGATA
 GATATGGTAAGGGAGGAGGAGGAAATGAAAATACGGATTGGCAGAAAGCTGCAGAAGCATG

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4 muestra un ADN de *spt6* de WCR ilustrativo adicional, referido en la presente invención en algunos casos como v1 (versión 1) de *spt6-1* de WCR, usado en
 25 algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

GACTCCGTACGCTACACCCCATACGCAGCAAACCTCCCCGCTATGGTCATCAAACACCTTCCC
AACACATGGCGAGCTCAGCACCAAGGTCTCAACAATCCCTTTTTACATCCTGGCGCGGTG
ACTCCCTCCCAACGAACTCCT

- 5 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5 muestra un ADN de *spt6* de WCR ilustrativo adicional, referido en la presente invención en algunos casos como v2 (versión 2) de *spt6-1* de WCR, que se usa en algunos ejemplos para la producción de un ARNdh:

AGAGTTCATACAGTAGTCATTTAAGTCATAATCAGCGAAGTGGAAGTTATGCTGAATCCTTAA
GATTCCAACCTCCCGAATCGCCGAGAAGCTCAGTGAGTAATAGAA

10

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6 muestra la secuencia de nucleótidos del promotor del fago T7.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7 muestra un fragmento de una región codificante de *YFP* ilustrativa.

- Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8-13 muestran los cebadores usados para amplificar porciones
15 de polinucleótidos de *spt6* de WCR ilustrativos que comprenden reg1 de *spt6-1*, v1 de *spt6-1*, y v2 de *spt6-1*, usados en algunos ejemplos para la producción de ARNdh.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:14 muestra un gen *YFP* ilustrativo.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:15 muestra una secuencia de ADN de la región 1 de *anexina*.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:16 muestra una secuencia de ADN de la región 2 de *anexina*.

- 20 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:17 muestra una secuencia de ADN de la región 1 de *beta* *espectrina* 2.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:18 muestra una secuencia de ADN de la región 2 de *beta* *espectrina* 2.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:19 muestra una secuencia de ADN de la región 1 de *mtRP-L4*.

- 25 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:20 muestra una secuencia de ADN de la región 2 de *mtRP-L4*.

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:21-48 muestran los cebadores usados para amplificar las regiones génicas de *anexina*, *beta espectralina 2*, *mtRP-L4*, y *YFP* para la síntesis de ARNdh.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:49 muestra una secuencia de ADN de maíz que codifica una proteína tipo TIP41.

- 5 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:50 muestra la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido cebador T20VN.

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:51-61 muestran los cebadores y sondas usados para el análisis de la expresión de los transcritos de ARNdh en maíz.

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

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

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

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

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:74-79 muestran los cebadores y sondas que pueden usarse para el análisis de la expresión de los transcritos de ARNdh en maíz en algunas modalidades.

- 20 La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:80 muestra un polinucleótido enlazador ilustrativo, que forma un “bucle” cuando se transcribe a un transcrito de ARN para formar una estructura de horquilla:

```
AGTCATCACGCTGGAGCGCACATATAGGCCCTCCATCAGAAAGTCATTGTGTATATCTCTCAT
AGGGAACGAGCTGCTTGCGTATTTCCCTTCCGTAGTCAGAGTCATCAATCAGCTGCACCGTG
TCGTAAAGCGGGACGTTGCAAGCTCGT
```

Las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81-84 muestran ARN transcritos a partir de ácidos nucleicos que comprenden polinucleótidos de *spt6* ilustrativos y fragmentos de estos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 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 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 del factor de elongación de la transcripción (*spt6*) mediada por iARN en la plaga de insectos ilustrativa, el gusano de la raíz del maíz occidental, que ha demostrado tener un fenotipo letal cuando, por ejemplo, las moléculas de ARNi se administran mediante ingestión o inyección de ARNdh de *spt6*. En modalidades de la presente invención, la capacidad de administrar ARNdh de *Spt6* 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). Mediante la combinación de la iARN mediada por *spt6* con otros objetivos de iARN útiles (por ejemplo, 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, 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 spt5*, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. núm.62/168613), 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). 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 ARNdh. 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 ARNdh, ARNip, ARNhp, miARN, y/o ARNh 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). Se describe un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos aisladas y purificadas que comprenden un polinucleótido, por ejemplo, tal como se establece en la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, 5 fragmentos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1, y los complementos de lo anterior. 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 10 de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y 3-5, y/o el 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 15 ejemplo, coleópteros) 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 y 3-5; fragmentos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y 3-5; y un polinucleótido que consiste en una secuencia parcial de un gen que comprende una de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y 3-5; y/o complementos de estas.

20 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.:81 (por ejemplo, al menos un polinucleótido seleccionado de un grupo que comprende las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:82-84), o el complemento de esta. Cuando se ingiere(n) por una plaga de insectos (por ejemplo, 25 coleópteros), la(s) molécula(s) de ARNi puede(n) silenciar o inhibir la expresión de un ADN de *spt6*

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 y 3-5) 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.

- 5 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 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 transgénica es una planta seleccionada del grupo que comprende maíz (*Zea mays*) y plantas de la familia *Poaceae*.
- 10
- 15

- Algunas modalidades involucran un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de la plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros). En estas y otras modalidades, puede proporcionarse una molécula de ácido nucleico, en donde la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNdh. En modalidades particulares, un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNdh puede unirse operativamente a un promotor, y también puede unirse operativamente a una secuencia de terminación de la transcripción. En modalidades particulares, un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de 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)
- 20
- 25

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 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.

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 modular la expresión de un gen objetivo en una célula de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros) 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 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 seleccionadas del grupo que consiste en: WCR; NCR; SCR; MCR; *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. speciosa* Germar; y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim.

En la presente invención también se describen métodos para administrar agentes de control, tales como una molécula de ARNi, a una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros). 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). 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 *spt6* 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). 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/o la expresión recombinante de otras moléculas de ARNi.

II. Abreviaturas

ARNdh ácido ribonucleico de doble hebra

15 GI inhibición del crecimiento

NCBI National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)

ADNg ADN genómico

ARNi ácido ribonucleico inhibidor

20 ORF marco abierto de lectura

iARN interferencia por ácido ribonucleico

miARN ácido microrribonucleico

ARNhp ácido ribonucleico de horquilla pequeño

ARNip ácido ribonucleico inhibidor pequeño

25 ARNh ácido ribonucleico de horquilla

- UTR región no traducida
- WCR gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte)
- NCR gusano de la raíz del maíz del norte (*Diabrotica barberi* Smith y Lawrence)
- MCR gusano de la raíz del maíz mexicano (*Diabrotica virgifera zea* Krysan y Smith)
- 5 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 (*Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber)
- SEM error estándar de la media
- 10 YFP proteína fluorescente amarilla

III. Términos

En la descripción y las tablas a continuación, se usa una serie de términos. Para proporcionar un entendimiento claro y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, que incluyen el

15 alcance que se le dará a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones:

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 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

20 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. speciosa* Germar; y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim.

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), con relación a una

25 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.

- 5 Cántigo: Tal como se usa en la presente invención el término “cántigo” 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).

- 10 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
- 15 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
- 20 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.

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
5 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
10 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
15 Lawrence (NCR); *D. u. howardi* (SCR); *D. v. zea* (MCR); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. speciosa* Germar, y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim.

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
20 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
25 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

5 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,
10 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).

15 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
20 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:

ATGATGATG polinucleótido

TACTACTAC “complemento” del polinucleótido

5 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 incluyen las conformaciones de una hebra, de doble hebra, parcialmente bicatenario, tricatenario, de horquilla, circular, y en candado.

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 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 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 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 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, ARNhn y/o ARNh.

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 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 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 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 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 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, 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.

- 5 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 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.

La herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales (BLAST™; Altschul *et al.* (1990)) del
15 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 de secuencias de ácidos
20 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.

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
5 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 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
10 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.

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

Condición de rigor elevado (detecta polinucleótidos que comparten al menos 90 % de identidad de
15 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.

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
20 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 rigurosa (los polinucleótidos que comparten al menos 50 % de identidad 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
25 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 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 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 %; 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 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 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 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 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 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 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 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 *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*.

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; 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 microproyectiles (Klein *et al.* (1987) Nature 327:70).

Transgén: Un ácido nucleico exógeno. En algunos ejemplos, un transgén puede ser un ADN que codifica una o ambas hebras de un ARN capaz de formar una molécula de ARNdh que comprende un polinucleótido que es complementario a una molécula de ácido nucleico que se encuentra en una plaga de coleópteros. En ejemplos adicionales, un transgén puede ser un polinucleótido antisentido, en donde la expresión del polinucleótido antisentido 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 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 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

5 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 que son dañinas para dicho cultivo que crece al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones, dichas
10 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
15 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
20 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

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, una plaga de coleópteros del género *Diabrotica*). Las moléculas de ácidos nucleicos descritas incluyen polinucleótidos objetivo (por ejemplo, genes nativos, y polinucleótidos no codificantes), ARNd_h, ARN_ip, ARN_hp, ARN_h, y miARN. Por ejemplo, en algunas modalidades se describen moléculas de ARNd_h, ARN_ip, miARN, ARN_hp, y/o ARN_h que pueden ser específicamente complementarias a la totalidad o parte de uno o más ácidos nucleicos nativos en una plaga de coleópteros. 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 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 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 de *spt6*. En ejemplos particulares, se selecciona un gen objetivo en una plaga de coleópteros, en donde el gen objetivo comprende un polinucleótido seleccionado entre las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y 3-5. En algunas modalidades, un gen objetivo puede ser una molécula de ácido nucleico que 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 aminoácidos de una proteína producida a partir de un polinucleótido de *spt6*. Un gen objetivo puede ser cualquier polinucleótido de *spt6* en una plaga de insectos, cuya inhibición postranscripcional tiene un efecto nocivo en el crecimiento, y/o la supervivencia 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 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 aminoácidos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2.

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). 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); donatriones (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, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhp, 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). 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 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 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 plagas de insectos (por ejemplo, coleópteros) pueden incluir: la totalidad o parte de un ácido nucleico nativo aislado de un organismo *Diabrotica* que comprende un polinucleótido de *spt6* (por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y 3-5); 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 *spt6*; 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 *spt6*; 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 *spt6*; 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, ARNdh, 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 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: la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 (por ejemplo, cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3-5); el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3-5; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3-5; 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.:3-5; 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.:3-5.

5 En modalidades particulares, el contacto con o la captación por parte de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros) de un ARNi transcrito a partir del polinucleótido aislado inhibe el crecimiento, el desarrollo, y/o la alimentación de la plaga. En algunas modalidades, el contacto con 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 absorción por el insecto se produce por medio de la aspersión de una planta que comprende el insecto con una composición
10 que comprende el ARNi.

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.:81; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:82; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE
15 IDENT.:82; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:83; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:84; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:84; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81-84; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81-84; un polinucleótido codificante nativo de un
20 organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81-84; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:81-84; 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.:81-84; 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.:81-84.

En modalidades particulares, el contacto con o la captación por parte de una plaga de coleópteros del polinucleótido aislado inhibe el crecimiento, el desarrollo, y/o la alimentación de la plaga.

- 5 En ciertas modalidades, las moléculas de ARNdh proporcionadas por la invención comprenden polinucleótidos complementarios a un transcrito de un gen objetivo que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 o un fragmento de esta, 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
- 10 seleccionado puede exhibir de aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 % de identidad de secuencias respecto a cualquiera de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; un fragmento contiguo de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; 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
- 15 %; 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 la
- 20 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; un fragmento contiguo de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3-5); o 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

25 polinucleótido nativo que se encuentra en una o más especies de plagas de insectos objetivo (por

ejemplo, una especie de plagas de coleópteros), o la molécula de ADN puede construirse como una quimera a partir de una pluralidad de dichos polinucleótidos específicamente complementarios.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico puede comprender un primer y un
5 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
10 capaces de unirse en forma covalente a una molécula de ácido nucleico. 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
15 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 apareamiento intramolecular
20 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), un derivado de este, o un polinucleótido complementario de este.

Las moléculas de ácidos nucleicos de ARNdh comprenden hebras dobles de ribonucleótidos
25 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 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 las 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) 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 ARNd_h a, por ejemplo, una plaga de coleópteros, la molécula de ARNd_h inhibe la expresión de al menos dos

5 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)

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

10 sencillo. Por ejemplo, solamente una pequeña cantidad de polinucleótidos nativos en una plaga de coleópteros 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 en el crecimiento, la viabilidad, y/o el desarrollo de una plaga de insectos. La amplia

15 mayoría de los polinucleótidos nativos de plagas de coleópteros, 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

20 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 ARNd_h que se proporcionarán en la planta huésped de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros))

25 se seleccionan para dirigir las a los ADNc que codifican proteínas o partes de proteínas esenciales

para el crecimiento y/o 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. 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 (por ejemplo, *Z. mays*), por ejemplo, puede transformarse de manera que contenga uno o más polinucleótidos derivados de la plaga de coleópteros tal como se proporciona en la presente invención. El 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 desarrollo.

Por consiguiente, en algunas modalidades, se selecciona como objetivo un gen que participa esencialmente en el crecimiento y desarrollo de una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros). 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 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 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

5 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); (b) explorar una biblioteca de ADNc o ADNg con una sonda que comprende la totalidad o una porción de un
10 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
15 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
20 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 (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 5 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 de 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 10 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 15 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 20 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 25 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 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, 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, y/o estabilización de las hebras bicatenarias de la molécula de ARNd.

En las modalidades, una molécula de ARNd puede formarse por una única hebra de ARN autocomplementaria o a partir de dos hebras de ARN complementarias. Las moléculas de ARNd 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 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, con 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 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.

D. Vectores recombinantes y transformación de células huésped

En algunas modalidades, la invención también proporciona una molécula de ADN para su introducción a 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), 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 A1).

En modalidades específicas, una molécula de ADN recombinante de la invención puede comprender un polinucleótido que codifica un ARN que puede formar una molécula de 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) 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 ARNdh puede formarse mediante la transcripción de un polinucleótido que es sustancialmente homólogo a un polinucleótido
5 seleccionado del grupo que consiste en la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 (por ejemplo, las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3-5); el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende
10 cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3-5; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3-5; 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.:3-5; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un
15 polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3-5.

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.:3-5; el complemento de cualquiera de las SEC.
20 CON NÚM. DE IDENT.:3-5; fragmentos de al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; y los complementos de fragmentos de al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1.

En modalidades particulares, una molécula de ADN recombinante que codifica un ARN que puede formar una molécula de ARNdh puede comprender una región codificante en donde al menos dos
25 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 antisentido. El polinucleótido sentido o el polinucleótido antisentido pueden ser sustancialmente homólogos a un gen objetivo (por ejemplo, un gen *spt6* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y 3-5) 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 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 las 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 polinucleótidos pueden expresarse como una horquilla con una estructura de tallo y bucle al tomar un primer segmento correspondiente a un polinucleótido del gen objetivo (por ejemplo, un gen *spt6* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y 3-5, 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 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 tallo y bucle que comprende el segundo segmento. Ver, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes de EE.UU. núm. 2002/0048814 y 2003/0018993; y las Publicaciones Internacionales PCT núm. WO94/01550 y WO98/05770. Una molécula de ARNdh puede generarse, por ejemplo, en forma de

una estructura de doble hebra 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) se mejora por medio de la coexpresión de un fragmento del gen 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 niveles de expresión de una o más moléculas de ARNi que inhiben la plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros). 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), 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 que infestan la planta huésped transgénica. En algunas modalidades, la supresión de la expresión del gen objetivo en una plaga objetivo de coleópteros 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 AGRtu.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 los 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 ARNd_h, 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 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 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 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 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 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 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). 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 pueden 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 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 algunas modalidades, un plásmido de la presente invención que ya contiene al menos un 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 genes que se inhibirán pueden obtenerse a partir de la misma especie de plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros), 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 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, fosfotricina, 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.

- 5 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
- 10 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
- 15 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.
- 20 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). Los vectores de

25 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
5 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,
10 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
15 aplicación de técnicas como estas, las células de prácticamente cualquier especie pueden transformarse de manera estable. En algunas modalidades, el ADN transformante se integra en el genoma de la célula huésped. En el caso de especies multicelulares, las células transgénicas pueden regenerarse en un organismo transgénico. Cualquiera de estas técnicas puede usarse para producir una planta transgénica, por ejemplo, que comprende uno o más ácidos nucleicos
20 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* 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
25 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 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 polinucleótidos para la transferencia tales como un ácido nucleico que codifica ARNdh.

Por consiguiente, en algunas modalidades 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 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 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 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 detectar el rasgo genético marcador deseado.

5 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 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
10 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 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
15 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 plaga de coleópteros) en las plantas en regeneración, puede realizarse una variedad de ensayos. Tales
20 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 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 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 pueden aplicarse al ADNg derivado de cualquier especie vegetal (por ejemplo, *Z. mays*) 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 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 T₀, para producir semilla T₁. Una cuarta parte de la semilla T₁ producida será homocigota con respecto al transgén. La germinación de la semilla T₁ resulta en plantas que pueden someterse a prueba para determinar la heterocigosidad, 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 tiene un efecto inhibidor de la plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros). Las moléculas de ARNi (por ejemplo, molécula 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, el locus definido por la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1), 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 la molécula de ARNi en la segunda línea vegetal.

En algunos aspectos, se incluyen las semillas y los productos básicos producidos por las plantas transgénicas derivadas de 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).

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 distinto al definido por la SEC.

CON NÚM. DE IDENT.:1, 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 *spt5* (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 (por ejemplo, un nemátodo parasitario de plantas); un gen que codifica una proteína insecticida (por ejemplo, una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*); 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 puede 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.

15 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) 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. 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 del 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 algunas 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, y SCR)), 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), 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 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 de 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 algunas modalidades de la invención, puede usarse cualquier forma de molécula de ARNi. Los expertos en la técnica entenderán que las moléculas de ARNdh 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. Por consiguiente, si bien las moléculas de ARNip y miARN, por ejemplo, pueden ser igualmente efectivas en algunas modalidades, una molécula de ARNdh 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 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). En ciertas

modalidades, la molécula de ARNi transcrita *in vitro* puede ser una molécula de ARNdh 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 producirse la inhibición postranscripcional de un gen objetivo en la plaga (por ejemplo, un gen esencial).

- 5 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 objetivo en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros), 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.:4; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4; la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; el complemento de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3-5; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende cualquiera de las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3-5; 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.:3-5; 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.:3-5. En ciertas modalidades, la expresión de una molécula de ácido nucleico que es al menos aproximadamente 80 % idéntica (por ejemplo, 79 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87

%, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 100 %, y 100 %) puede usarse con cualquiera de

5 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).

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
10 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 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
15 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 a 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 específica de la secuencia; es decir, los polinucleótidos sustancialmente homólogos a la(las)
20 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 con una o más inserciones, eliminaciones, y/o mutaciones puntuales con relación a un
25 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 aproximadamente 86 %, al menos de aproximadamente 87 %, al menos de aproximadamente 88 %, al menos de aproximadamente 89 %, al menos de aproximadamente 90 %, al menos de aproximadamente 91 %, al menos de aproximadamente 92 %, al menos de aproximadamente 93 %, al menos de aproximadamente 94 %, al menos de aproximadamente 95 %, al menos de aproximadamente 96 %, al menos de aproximadamente 97 %, al menos de aproximadamente 98 %, al menos de aproximadamente 99 %, al menos de aproximadamente 100 %, y 100 % de identidad de secuencias. De manera alternativa, la región bicatenaria de una molécula de ARNdh 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, menos homólogo. La longitud del polinucleótido de una región bicatenaria de una molécula de ARNdh 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 100-500 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) 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.

- 5 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 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
- 10 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 las células vegetales
- 15 se describe en las Patentes de EE.UU. 5,107,065; 5,759,829; 5,283,184; y 5,231,020.

C. Expresión de las 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 de insectos (por ejemplo, coleópteros) 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,
- 20 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, 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
- 25 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 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 moléculas de ARNi. El término “microorganismo” incluye especies procariotas y eucariotas, tales como bacterias y hongos.

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) comprende proporcionar en el tejido del huésped de la plaga una cantidad supresora de genes de al menos una molécula de ARNdh formada después de la transcripción de un polinucleótido tal como se describe en la presente 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 ARNdh, que incluye su forma modificada tal como una molécula de ARNip, miARN, ARNh_p, 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 *spt6*, por ejemplo, que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 y 3-5.

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 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
5 crea una célula vegetal transgénica o una planta transgénica que contiene un constructo de ADN recombinante que proporciona una molécula de ARNdh estabilizada de la invención. Las células vegetales transgénicas y las plantas transgénicas que comprenden ácidos nucleicos que codifican una molécula de ARNi particular pueden producirse mediante el uso de tecnologías de ADN recombinante (dichas tecnologías básicas son muy conocidas en la técnica) para construir un
10 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,
15 coleópteros), 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
20 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
25 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.

- 5 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
- 10 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
- 15 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) causado por una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros) que se alimenta de la planta, en donde el método comprende proporcionar en la planta huésped una
- 20 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 la reducción del desarrollo 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)
- 25 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) comprenden 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. 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 algunas 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), 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

En algunas modalidades, se proporciona un método para modular la expresión de un gen objetivo en una plaga de insectos (por ejemplo, coleópteros), 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.

Las moléculas de ARNi de la invención pueden incorporarse dentro de las semillas de una especie vegetal (por ejemplo, maíz), 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). 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 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.

5 **EJEMPLOS**

EJEMPLO 1: Materiales y métodos

Preparación de muestras y bioensayos

Una serie de moléculas de ARNdh (que incluyen las correspondientes a reg1 de *spt6-1* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3), v1 de *spt6-1* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4), y v2 de *spt6-1* (SEC. 10 CON NÚM. DE IDENT.:5) se sintetizaron y purificaron con el uso de un estuche MEGAscript® RNAi Kit o el estuche HiScribe® T7 In Vitro Transcription Kit. 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 un testigo de fondo para la mortalidad o la inhibición del crecimiento de WCR (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Las concentraciones de las moléculas 15 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).

20 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 25 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

5 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
10 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;

15 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
20 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 de la
25 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 las secuencias 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 RESEARCH Center, Cincinnati, OH):

- 10 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
- 15 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).
- 20 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
- 25 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

5 (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
10 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 separados para la comparación del tamaño molecular. El gel
15 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 resultó en más de
20 600,000 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
25 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 insectos coleópteros. Se identificaron los homólogos de genes

5 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 se
10 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
15 búsqueda por BLASTX confirmaron que las secuencias de genes 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 las lecturas de secuencias no ensambladas seleccionados
20 por homología a un gen candidato no perteneciente a *Diabrotica* se superponían, y que el ensamble de los cóntigos no había logrado 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.

Un gen objetivo candidato que codifica *spt6* de *Diabrotica* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1) se identificó como un gen que pueden conducir a la mortalidad de plagas de coleópteros, la inhibición del crecimiento, o la inhibición del desarrollo en WCR.

La proteína de *spt6* chaperona de histonas altamente conservada y funcional desempeña una importante función en el control de la transcripción en *Drosophila*. Participa en múltiples etapas de la transcripción, que incluyen la iniciación, la elongación y la terminación. Interactúa con varios factores importantes, que incluyen ARN polimerasa II (ARNPII), histonas, y factores de transcripción. *Spt6* puede ensamblar los nucleosomas y restaurar la estructura normal de la cromatina en el inicio de la transcripción por ARNPII, por medio de su interacción directa con los tetrameros H3/H4 de los nucleosomas.

La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 es novedosa. La secuencia no se proporciona en las bases de datos públicas, y no se describe en la Publicación de Patente Internacional PCT núm. WO/2011/025860; Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 20070124836; Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 20090306189; Solicitud de Patente de EE.UU. núm. US20070050860; Solicitud de Patente de EE.UU. núm.20100192265; Patente de EE.UU. núm. 7,612,194; o Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2013192256. El *spt6-1* de WCR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1) tiene cierta relación con un fragmento de una secuencia de *Pediculus humanus corporis* (núm. de acceso de GENBANK XM_002424131.1). El homólogo más cercano de la secuencia de aminoácidos de SPT6-1 de WCR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2) es una proteína de *Tribolium castaneum* que tiene núm. de acceso de GENBANK XP_008196911.1 (88 % similar; 79 % idéntica respecto a la región de homología).

Los transgenes de ARNdh de *spt6* 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 *spt6* 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 *spt6* 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 del gusano de la raíz resistentes a cualquiera de estas tecnologías de control del gusano de la raíz.

- 5 Se usaron clones de longitud completa o parcial de secuencias de un gen candidato de *Diabrotica*, referido en la presente invención como *spt6*, para generar amplicones de PCR para la síntesis de ARNdh.

EJEMPLO 3: Amplificación de genes objetivo para producir ARNdh

- Se usaron clones de longitud completa o parcial de secuencias de un gen candidato de *Diabrotica*,
10 referido en la presente invención como *spt6*, 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.:6) se incorporó en los extremos 5' de las hebras sentido o antisentido amplificadas. Ver la Tabla 1. El ARN total se
15 extrajo 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
20 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.:7; 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 *spt6* ilustrativo y el gen *YFP* de control negativo.

	ID del Gen	ID del Cebador	Secuencia
5	Par 1	<i>spt6-1</i>	Dvv-spt6-1_For TTAATACGACTCACTATAGGGAGACGCCTTACAC TCCAAGTGGTCAAAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8)
			Dvv-spt6-1_Rev TTAATACGACTCACTATAGGGAGACATGCTTCTG CAGCTTTCTGCCAATC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9)
10	Par 2	<i>spt6-1 v1</i>	Dvv-spt6-1_v1_For TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACTCCGTAC GCTACACCCCATAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10)
			Dvv-spt6-1_v1_Rev TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGAGTTCGT TGGGAGGGAGTCAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:11)
15	Par 3	<i>spt6-1 v2</i>	Dvv-spt6-1_v2_For TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGAGTTCATA CAGTAGTCATTTAAGTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:12)
			Dvv-spt6-1_v2_Rev TTAATACGACTCACTATAGGGAGATTCTATTACT CACTGAGCTTCTCG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:13)
	Par 4	YFP	YFP-F_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGAcaccatgggctcc agcggcgccc (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:21)
			YFP-R_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGAagatcttgaaggc gctcttcagg (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:24)

EJEMPLO 4: Constructos de iARN

20 Preparación de las plantillas mediante PCR y síntesis del ARNdh

Una estrategia usada para proporcionar las plantillas específicas para la producción de ARNdh de *spt6* y *YFP* se muestra en la Figura 1. Las plantillas de ADN proyectadas para su uso en la síntesis de ARNdh de *spt6* se prepararon mediante PCR con el uso de los pares de cebadores en la Tabla 1 y el ADNc de primera hebra (como plantilla de PCR) preparado a partir del ARN total aislado de

25 huevos, larvas de primer estadio, o adultos de WCR. Para cada región de los genes objetivo *spt6* 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 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 ARNdh. 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.:3 (reg1 de *spt6-1*), la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4 (v1 de *spt6-1*), la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5 (v2 de *spt6-1*), y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7 (*YFP*). El ARN de doble hebra para el bioensayo con insectos se sintetizó y se purificó con el uso de un estuche Ambion®MEGAscript® 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).

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 *spt6* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1) 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 *spt6* en orientaciones opuestas entre sí, los dos segmentos se separan por un polinucleótido enlazador (por ejemplo, un bucle (tal como la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:80) y un intrón ST-LS1 (Vancanneyt *et al.* (1990) Mol. Gen. Genet. 220(2):245-50)). Por consiguiente, el transcrito primario de ARNm contiene las dos secuencias de segmentos del gen *spt6* 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 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 ZmPer5 3'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.

10 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 *spt6* 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 región codificante de AAD-1. Un fragmento que comprende una región no traducida 3' de un gen de lipasa del maíz (ZmLip 3'UTR; Patente de EE.UU. 7,179,902) se usa para terminar la transcripción del ARNm de AAD-1.

20 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 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 comprende una región codificante de YFP (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:14) 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

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 *spt6-1*, v1 de *spt6-1*, y v2 de *spt6-1* resultó en la mortalidad y/o inhibición del 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 *spt6-1*, v1 de *spt6-1*, y v2 de *spt6-1*, así como también los resultados obtenidos con una muestra de control negativo de ARNdh preparado a partir de una región codificante de la proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7). La Tabla 3 muestra los resultados de LC₅₀ y GI₅₀ de la exposición a ARNdh de v1 de *spt6-1* y v2 de *spt6-1*.

Tabla 2. Resultados de los ensayos de alimentación con dieta de ARNdh de *spt6* obtenidos con larvas del gusano de la raíz del maíz occidental después de 9 días de alimentación. El análisis 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>spt6-1</i>	500	4	89.51 ± 4.35 (A)	0.98 ± 0.00 (A)
v1 de <i>spt6-1</i>	500	9	85.06 ± 4.17 (A)	0.98 ± 0.01 (A)
v2 de <i>spt6-1</i>	500	9	85.49 ± 2.91 (A)	0.98 ± 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 ± 0.07 (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 *spt6* en larvas de WCR (ng/cm²).

Nombre del gen	LC ₅₀	Rango	GI ₅₀	Rango
v1 de <i>spt6-1</i>	46.41	34.40 - 63.29	18.22	11.28 - 29.43
v2 de <i>spt6-1</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 *spt6-1*, v1 de *spt6-1*, y v2 de *spt6-1* 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*, *beta espectralina 2*, y *mtRP-L4* son eficaces en el control de insectos mediado por la iARN. La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:15 es la secuencia de ADN de la región 1 (Reg 1) de *anexina*, y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:16 es la secuencia de ADN de la región 2 (Reg 2) de *anexina*. La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:17 es la secuencia de ADN de la región 1 (Reg 1) de *beta espectralina 2*, y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:18 es la secuencia de ADN de la región 2 (Reg2) de *beta espectralina 2*. La SEC. CON NÚM. DE IDENT.:19 es la secuencia de ADN de la región 1 (Reg 1) de *mtRP-L4*, y la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:20 es la secuencia de ADN de la región 2 (Reg 2) de *mtRP-L4*. Una secuencia de YFP (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7) también se usó para producir ARNdh como un control negativo.

Cada una de las secuencias mencionadas anteriormente se usó para producir ARNdh mediante los métodos del EJEMPLO 3. La estrategia usada para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNdh se muestra en la Figura 2. Las plantillas de ADN proyectadas para su uso en la síntesis de 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 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 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

5 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.

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

	Gen (Región)	ID de Cebador	Secuencia
15	YFP	YFP-F_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACACCATGGGCT CCAGCGGCGCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:21)
	YFP	YFP-R	AGATCTTGAAGGCGCTCTTCAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:22)
20	YFP	YFP-F	CACCATGGGCTCCAGCGGCGCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:23)
	YFP	YFP-R_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGATCTTGAAG GCGCTCTTCAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:24)
25	Anexina (Reg 1)	Ann-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTCCAACAGT GGTTCCTTATC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:25)
	Anexina (Reg 1)	Ann-R1	CTAATAATTCTTTTTTAATGTTCTGAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:26)
	Anexina (Reg 1)	Ann-F1	GCTCCAACAGTGGTTCCTTATC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:27)
	Anexina (Reg 1)	Ann-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTAATAATTCTT TTTTAATGTTCTGAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:28)

5	Par 9	Anexina (Reg 2)	Ann-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGATTGTTACAAGC TGGAGAACTTCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:29)
		Anexina (Reg 2)	Ann-R2	CTTAACCAACAACGGCTAATAAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:30)
10	Par 10	Anexina (Reg 2)	Ann-F2	TTGTTACAAGCTGGAGAACTTCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:31)
		Anexina (Reg 2)	Ann-R2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTTAACCAACA ACGGCTAATAAGG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:32)
15	Par 11	Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGATGTTGGCT GCATCTAGAGAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:33)
		Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-R1	GTCCATTCGTC CATCCACTGCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:34)
20	Par 12	Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-F1	AGATGTTGGCTGCATCTAGAGAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:35)
		Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCCATTCGTC CATCCACTGCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:36)
25	Par 13	Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAGATGAACA CCAGCGAGAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:37)
		Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-R2	CTGGGCAGCTTCTTGTTTCCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:38)
30	Par 14	Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-F2	GCAGATGAACACCAGCGAGAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:39)
		Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-R2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTGGGCAGCTT CTTGTTTCCTC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:40)
35	Par 15	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTGAAATGTT AGCAAATATAACATCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:41)
		mtRP-L4 (Reg 1)	L4-R1	ACCTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:42)

5	Par 16	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-F1	AGTGAAATGTTAGCAAATATAACATCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:43)
		mtRP-L4 (Reg 1)	L4-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAACCTCTCACTT CAAATCTTGACTTTG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:44)
10	Par 17	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAGTCAAGA TTTGAAGTGAGAGGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:45)
		mtRP-L4 (Reg 2)	L4-R2	CTACAAATAAAACAAGAAGGACCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:46)
15	Par 18	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-F2	CAAAGTCAAGATTTGAAGTGAGAGGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:47)
		mtRP-L4 (Reg 2)	L4-R2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTACAAATAAA ACAAGAAGGACCCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:48)

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.

15	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
20	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
25	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

5 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 *spt6* (por ejemplo, la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1)) a través de la expresión de un gen quimérico integrado de manera estable en el genoma de la planta se producen mediante la transformación
10 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
15 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
20 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) contiene: 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 μ M 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 microcentrífuga que contienen 2.0 ml de una suspensión de células de *Agrobacterium* apropiadas en medio de inoculación líquido con 200 µM de acetosiringona, a la cual se agregan 2 µl 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. Los contenidos del tubo se vierten después 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 AgNO₃; 200 µM 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 µmol m⁻²s⁻¹ de radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés).

Selección de callos y regeneración de eventos transgénicos. Después del periodo 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 AgNO₃; 0.5 g/l de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico monohidratado; PHYTOTECHNOLOGIES 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
5 selección 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 incuban a 27 °C con
10 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 mg/l de hidrolizado
15 enzimático de caseína; 1.0 mg/l de AgNO_3 ; 0.25 g/l de MES; 0.5 mg/l de ácido naftalenacético en NaOH; 2.5 mg/l de ácido abscísico en etanol; 1 mg/l de 6-bencilaminopurina; 250 mg/l de carbenicilina; 2.5 g/l de Gelzan™; y 0.181 mg/l de ácido Haloxifop; a pH 5.8. Las placas se almacenan en cajas transparentes y se incuban a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR durante 7 días. Los callos en regeneración se transfieren después (<6/placa) a
20 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 g/l de goma Gellan™; y 0.181 mg/l de ácido R-Haloxifop; a pH 5.8.
25 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, fotoperiodo de 16-horas, 50 a 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

- 5 Los análisis moleculares (por ejemplo, RT-qPCR) de los tejidos de maíz se realizan en muestras de hojas y/o raíces que se recolectaron de plantas cultivadas en el invernadero el día antes 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
10 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
15 ADN_g se usan para calcular 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 *spt6*) progresan a estudios adicionales en el invernadero.

- 20 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
25 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). El

5 ARN se aísla con el uso de un estuche Norgen BioTek™ Total RNA Isolation Kit (Norgen, Thorold, ON). 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

10 (INVITROGEN) en un volumen de reacción de 10 μl con 5 μl de ARN desnaturalizado, sustancialmente de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. El protocolo se modifica 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.:50) en el tubo de 1 ml de mezcla de reserva de cebadores aleatorios, para preparar

15 una reserva de trabajo de cebadores aleatorios combinados y oligo dT.

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

20 reacción de 10 μl. Para el ensayo del gen objetivo, las reacciones se ejecutan con los cebadores spt6-1v1_62 F (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:58) y spt6-1v1_360 R (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:56), y un conjunto de sondas IDT oligo personalizadas para *spt6* PRB Conjunto1, marcadas con FAM y doblemente desactivadas con desactivadores Zen y Iowa Black. Para el ensayo del gen de referencia tipo TIP41, se usan los cebadores TIPmxF (SEC. CON NÚM. DE

IDENT.:53) y TIPmxR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:54), y la sonda HXTIP (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:55) 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>spt6</i>	spt6 v2 FWD Conjunto 1	AAGATCCTGCCTGAACCTGC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:58)
<i>spt6</i>	<i>spt6</i> v2 REV Conjunto 1	GGAAATACGCAAGCAGCTCG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:56)
<i>spt6</i>	<i>spt6</i> v2 FAM	CATCCTGGCGCGGTGACTCC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:57)
<i>spt6</i>	Spt6-1v2_86 F	TCCTGCAAGAACGTGGGTAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:61)
<i>spt6</i>	Spt6-1v2_323 R	GGAAATACGCAAGCAGCTCG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:59)
<i>spt6</i>	Spt6-1v2_182 P	CCAACCTCCCGAATCGCCGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:60)
TIP41	TIPmxF	TGAGGGTAATGCCAACTGGTT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:53)

TIP41	TIPmxR	GCAATGTAACCGAGTGTCTCTCAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:54)
TIP41	HXTIP (HEX-Sonda)	TTTTTGGCTTAGAGTTGATGGTGTACTGATGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:55)

*Proteína tipo TIP41.

5

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

	Gen Objetivo	Gen tipo TIP
Componente	Concentración final	
Tampón de Roche	1 X	1X
<i>spt6</i> FWD Conjunto 1	0.4 µM	0
<i>spt6</i> REV Conjunto 1	0.4 µM	0
<i>spt6</i> FAM	0.2 µM	0
HEXtipZM F	0	0.4 µM
HEXtipZM R	0	0.4 µM
HEXtipZMP (HEX)	0	0.2 µM
ADNc (2.0 µl)	NA	NA
Agua	Hasta 10 µl	Hasta 10 µl

10

15

Tabla 8. Condiciones del termociclador para la 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

20

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

25

de expresión, los valores de expresión se calculan con el uso del método $\Delta\Delta C_t$ (es decir, $2^{-(C_q \text{ OBJETIVO} - C_q \text{ REF})}$), que se apoya en la comparación de las diferencias de los valores de C_q 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.

- 5 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 de *spt6* en plantas transgénicas que expresan un ARNdh de horquilla de *spt6*.

Todos los materiales y equipos se tratan con RNasezap (AMBION/INVITROGEN) antes de su uso.

- 10 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
- 15 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
- 20 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

- 25 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.:3-5, 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™ (García

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 ADNg se aísla en un formato de alto rendimiento con el uso de un estuche Biosprint96 PLANT KIT y un robot de extracción Biosprint96. El ADNg 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, *spt6*), la secuencia enlazadora (por ejemplo, un bucle, SEC. CON NÚM. DE IDENT.:80), 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.:62; 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.:63; oligonucleótidos GAAD1 en la Tabla 9) se diseñan con el uso del software Primer Express (Applied Biosystems). La Tabla 9 muestra las secuencias de 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.:64; 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 ADNg 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 describe en la Tabla 11. La activación del fluoróforo y la emisión de las sondas marcadas con FAM

y HEX son tal 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	TGTTTCGGTTCCTCTACCAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:65)
GAAD1-R	CAACATCCATCACCTTGACTGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:66)
GAAD1-P (FAM)	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:67)
IVR1-F	TGGCGGACGACGACTTGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:68)
IVR1-R	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:69)
IVR1-P (HEX)	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:70)
SPC1A	CTTAGCTGGATAACGCCAC (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:71)
SPC1S	GACCGTAAGGCTTGATGAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:72)
TQSPEC (CY5*)	CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:73)
Loop_F	GGAACGAGCTGCTTGCGTAT(SEC. CON NÚM. DE IDENT.:77)
Loop_R	CACGGTGCAGCTGATTGATG(SEC. CON NÚM. DE IDENT.:78)
Loop_FAM	TCCCTTCCGTAGTCAGAG(SEC. CON NÚM. DE IDENT.:79)

*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.

Análisis del número de copias genómicas			
Proceso	Temp.	Tiempo	núm. de Ciclos
Activación del 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

Bioensayos 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 objetivo con varios tejidos vegetales o piezas de tejido derivados de una planta que produce un ARNdh insecticida en un ambiente de 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 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 y se colocan en cada uno de los pocillos de la bandeja de bioensayo. Después, los pocillos se cubren con una cubierta de lengüeta 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
5 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
10 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
15 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
20 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 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 T_0 de *Zea mays* tal como se describió en el EJEMPLO 6. Se obtienen de 10 a 20 líneas T_1 adicionales de *Zea mays* independientes que 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. Los

5 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. 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

10 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.

15 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), 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 *spt5* (Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 62/168613).

20 Estas se confirman a través de RT-PCR u otros métodos de análisis molecular.

Las preparaciones de ARN total de las líneas T_1 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

25 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 *Zea mays*. 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.

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 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, 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 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 usan entonces para el control de plagas de coleópteros.

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 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 coleópteros 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 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 y los patrones de crecimiento de las plantas transgénicas y las 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.

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 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). 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 de iARN y secuencias de control adicionales de plagas de coleópteros

Una planta transgénica de *Zea mays* que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe a una molécula de ARNi dirigida a un organismo de una plaga de coleópteros (por ejemplo, al menos una molécula de ARNdh que incluye una molécula de ARNdh dirigido a un gen que comprende la SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1) 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, Cry1I, 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 los 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: ARNdh de *spt6* en el manejo de insectos

Los transgenes de ARNdh de *Spt6* 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 *spt6* son útiles para prevenir el daño causado por la alimentación de insectos coleópteros. Los transgenes de ARNdh de *spt6* también se combinan en plantas con tecnología de proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* para representar nuevos modos de acción en pirámides de genes para el manejo de la resistencia de los insectos. Cuando se combinan con

5 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.