



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 959 628**

⑮ Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2014 PCT/US2014/071583**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15095750**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2014 E 14870967 (8)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023 EP 3082469**

---

⑮ Título: **Moléculas de ácido nucleico RNAPII-140 que confieren resistencia a plagas de coleópteros**

⑩ Prioridad:

**20.12.2013 US 201361919239 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.02.2024**

⑬ Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. (100.0%)  
Hansastraße 27c  
80686 München, DE**

⑭ Inventor/es:

**NARVA, KENNETH E.;  
ARORA, KANIKA;  
RANGASAMY, MURUGESAN;  
VEERAMANI, BALAJI;  
GANDRA, PREMCHAND;  
WORDEN, SARAH E.;  
LI, HUARONG;  
VILCINSKAS, ANDREAS y  
KNORR, EILEEN**

⑮ Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 959 628 T3**

---

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Moléculas de ácido nucleico RNAPII-140 que confieren resistencia a plagas de coleópteros

5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere en general al control del daño a las plantas causado por plagas de coleópteros. En realizaciones particulares, la presente invención proporciona secuencias codificantes y no codificantes diana, y el uso de tecnologías de ácidos nucleicos para reprimir o inhibir postranscripcionalmente la expresión de secuencias codificantes y no codificantes diana en las células de una plaga de coleópteros para proporcionar un efecto protector de planta.

Antecedentes

15 El gusano de la raíz del maíz occidental (WCR), *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, es una de las especies de gusanos de la raíz del maíz más devastadoras en América del Norte y es una preocupación particular en las áreas productoras de maíz del Medio Oeste 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 del mismo rango como el WCR. Hay varias otras subespecies relacionadas de *Diabrotica* que son plagas importantes en América del Norte: el gusano de la raíz del maíz mexicano (MCR), *D. virgifera zeae* Krysan y Smith; el gusano de la raíz del maíz del sur (SCR), *D. undecimpunctata howardi* Barber; *D. balteata* LeConte; *D. undecimpunctata tenella*; y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos estima actualmente que los gusanos de la raíz del maíz causan mil millones de dólares en pérdidas de ingresos cada año, que incluyen 800 millones de dólares en pérdidas de rendimiento y 200 millones de dólares en costes de tratamiento.

20 25 Tanto los huevos de WCR como los de NCR se depositan en el suelo durante el verano. Los insectos permanecen en estadio de huevo durante todo el invierno. Los huevos son oblongos, blancos y miden menos de 0.010 cm de largo. Las larvas eclosionan a finales de mayo o principios de junio, y el momento preciso de la eclosión de los huevos varía de un año a otro debido a las diferencias de temperatura y la ubicación. Las larvas recién eclosionadas son gusanos blancos que miden menos de 0.3175 cm 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 larvales. Despues de alimentarse durante varias semanas, las larvas mudan al estadio de pupa. Se convierten en pupas en el suelo y luego emergen del suelo como adultos en julio y agosto. Los gusanos de raíz adultos miden aproximadamente 0.635 cm de longitud.

30 35 40 Las larvas del gusano de la raíz del maíz completan su desarrollo en el maíz y en varias otras especies de pastos. Las larvas criadas en cola de zorra amarilla emergen más tarde y tienen una cápsula de cabeza más pequeña cuando son adultas que las larvas criadas en maíz. Ellsbury et al. (2005) *Environ. Entomol.* 34:627-634. Los adultos de WCR se alimentan de fibras de maíz, polen y granos en las puntas de las mazorcas establecidas. Si los adultos de WCR emergen antes de que los tejidos reproductivos del maíz estén presentes, se pueden alimentar del tejido de las hojas, lo que ralentiza el crecimiento de la planta y ocasionalmente mata a la planta huésped. Sin embargo, los adultos cambiarán rápidamente a las fibras y polen preferidos cuando estén disponibles. Los adultos de NCR también se alimentan de tejidos reproductivos de la planta de maíz, pero rara vez se alimentan de hojas de maíz.

45 50 55 La mayor parte del daño causado por los gusanos de la raíz en el maíz es causada por la alimentación de las larvas. Los gusanos de la raíz recién eclosionados se alimentan inicialmente de los finos pelos de las raíces del maíz y excavan en las puntas de las raíces. A medida que las larvas crecen, se alimentan y excavan en las raíces primarias. Cuando los gusanos de la raíz del maíz abundan, la alimentación de las larvas a menudo resulta en la poda de las raíces hasta la base de la caña del maíz. Las lesiones graves de las raíces interfieren con la capacidad de las raíces para transportar agua y nutrientes en la planta, reducen el crecimiento de la planta y dan como resultado una producción de granos, lo que a menudo reduce drásticamente el rendimiento general. Los daños graves a las raíces también suelen provocar el acame de las plantas de maíz, lo que dificulta la cosecha y reduce aún más el rendimiento. Además, la alimentación de los adultos con los tejidos reproductivos del maíz puede provocar la poda de las fibras en la punta de la mazorca. Si este "corte de fibra" es lo suficientemente severo durante la liberación de polen, se puede interrumpir la polinización.

60 65 El control de los gusanos de la raíz del maíz se puede intentar mediante la rotación de cultivos, insecticidas químicos y biopesticidas (por ejemplo, la bacteria grampositiva formadora de esporas, *Bacillus thuringiensis*), o una combinación de los mismos. La rotación de cultivos adolece del importante inconveniente de imponer restricciones no deseadas al uso de las tierras agrícolas. Más aún, la oviposición de algunas especies de los gusanos de la raíz puede ocurrir en los campos de soja, mitigando esta manera la eficacia de la rotación de cultivos practicada con maíz y soja.

Los escarabajos europeos del polen (EPB) son plagas graves de la colza; tanto las larvas como los adultos se alimentan de flores y polen. Los escarabajos del polen que dañan los cultivos pueden provocar una pérdida de rendimiento del 20-40 %. La principal especie de plaga es *Meligethes aeneus*. Actualmente, el control del escarabajo del polen en la colza se basa principalmente en piretroides, que se espera que se eliminan pronto debido a su perfil ambiental y regulatorio. Más aún, se ha informado de resistencia del escarabajo del polen a los insecticidas químicos

existentes. Por lo tanto, se necesitan con urgencia soluciones respetuosas con el medio ambiente para el control del escarabajo del polen con modos de acción novedosos.

En la naturaleza, los escarabajos del polen pasan el invierno como adultos en el suelo o debajo de la hojarasca. En primavera, los adultos emergen de la hibernación y comienzan a alimentarse de flores de malas hierbas y migran a plantas de colza en flor. Los huevos se ponen en los capullos de las flores de colza. Las larvas se alimentan y se desarrollan en los capullos y las flores. Las larvas en el estadio tardío encuentran un sitio de pupación en el suelo. La segunda generación de adultos emerge en julio y agosto y se alimenta de varias plantas con flores antes de encontrar sitios para pasar el invierno.

Los insecticidas químicos son la estrategia más utilizada para lograr el control del gusano de la raíz del maíz. Sin embargo, el uso de insecticidas químicos es una estrategia imperfecta para el control del gusano de la raíz del maíz; se pueden perder más de mil millones de dólares en los Estados Unidos cada año debido al gusano de la raíz del maíz cuando los costes de los insecticidas químicos se suman a los costes del daño causado por el gusano de la raíz que puede ocurrir a pesar del uso de insecticidas. Las altas poblaciones de larvas, las fuertes lluvias y la aplicación inadecuada del(es) insecticida(s) puede(n) resultar en un control del gusano de la raíz del maíz inadecuado. Además, el uso continuo de insecticidas puede seleccionar cepas de gusanos de raíz resistentes a los insecticidas, así como generar importantes preocupaciones ambientales debido a la toxicidad de muchos de ellos para especies no diana.

La interferencia de ARN (ARNi) es un proceso que utiliza rutas celulares endógenas, mediante el cual una molécula de ARN de interferencia (ARNi) (por ejemplo, una molécula de ARNdc) que es específica para toda, o cualquier porción de tamaño adecuado, de una secuencia de gen diana da como resultado la degradación del ARNm codificado por la misma. En los últimos años, el ARNi se ha utilizado para realizar la "atenuación" de genes en una serie de especies y sistemas experimentales; por ejemplo, *Caenorhabditis elegans*, plantas, embriones de insectos y células en cultivo de tejidos. Véase, por ejemplo,, Fire et al. (1998) *Nature* 391:806-811; Martinez et al. (2002) *Cell* 110:563-574; McManus and Sharp (2002) *Nature Rev. Genetics* 3:737-747.

El ARNi logra la degradación del ARNm a través de una ruta endógena que incluye el complejo de proteína DICER. DICER escinde moléculas de ARNdc largas en fragmentos cortos de aproximadamente 20 nucleótidos, denominados ARN de interferencia pequeña (ARNip). El ARNip se desenrolla en dos ARN de cadena sencilla: la cadena pasajera y la cadena guía. La cadena pasajera se degrada y la cadena guía se incorpora en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC). Las moléculas de ácido ribonucleico microinhibidor (ARNmi) se pueden incorporar de manera similar en RISC. El silenciamiento genético postranscripcional ocurre cuando la cadena guía se une específicamente a una secuencia complementaria de una molécula de ARNm e induce la escisión por Argonaute, el componente catalítico del complejo RISC. Se sabe que este proceso se propaga sistémicamente a través del organismo a pesar de las concentraciones inicialmente limitadas de ARNip y/o ARNmi en algunos eucariotas tales como plantas, nematodos y algunos insectos.

Sólo los transcriptos complementarios al ARNip y/o ARNmi se escinden y degradan y, por lo tanto, la atenuación de la expresión del ARNm es específica de la secuencia. En las plantas existen varios grupos funcionales de genes DICER. El efecto de silenciamiento genético del ARNi persiste durante días y, bajo condiciones experimentales, puede provocar una disminución de la abundancia del transcripto diana del 90 % o más, con la consiguiente reducción de los niveles de la proteína correspondiente.

La Patente de EE.UU. No. 7,612,194 y las Publicaciones de Patentes de EE. UU. Nos. 2007/0050860, 2010/0192265, y 2011/0154545 divulgán una biblioteca de 9112 secuencias de etiqueta de secuencia expresada (EST) aisladas de pupas de *D. v. virgifera* de LeConte. Se sugiere en la Patente de EE.UU. No. 7,612,194 y Publicación de Patente de EE. UU. No. 2007/0050860 para ligar operativamente a un promotor una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una de varias secuencias parciales particulares de H<sup>+</sup>-ATPasa de tipo vacuolar de *D. v. virgifera* (V-ATPasa) divulgada en las mismas para la expresión de ARN antisentido en células vegetales. La Publicación de Patente de EE. UU. No. 2010/0192265 sugiere ligar operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia parcial particular de un gen de *D. v. virgifera* para la expresión de ARN antisentido en células vegetales. Adicionalmente, Patente de EE.UU. No. 7,943,819 divulga una biblioteca de 906 secuencias de etiqueta de secuencia expresada (EST) aisladas de larvas, pupas e intestinos medios disecados de *D. v. virgifera* LeConte, y sugiere ligar operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que sea complementaria a una secuencia parcial particular de un gen de proteína 4b del cuerpo multivesicular de *D. v. virgifera* cargado para la expresión de ARN de doble cadena en células vegetales.

No se proporciona ninguna sugerencia adicional en la Patente de EE.UU. No. 7,612,194, y Publicaciones de Patentes de EE. UU. Nos. 2007/0050860, 2010/0192265 y 2011/0154545 utilizar cualquier secuencia particular de las más de nueve mil secuencias enumeradas allí para la interferencia de ARN, distintas de las varias secuencias parciales particulares de V-ATPasa y las secuencias parciales particulares de genes de función desconocida. Además, ninguna

de la Patente de EE.UU. No. 7,612,194, y Publicaciones de Patentes de EE. UU. Nos. 2007/0050860 y 2010/0192265, y 2011/0154545 proporciona alguna orientación sobre qué otra de las más de nueve mil secuencias proporcionadas sería letal, o incluso útil, en especies de gusanos de la raíz del maíz cuando se utilizan como ARNdc o ARNip. La Patente de EE.UU. No. 7,943,819 no proporciona ninguna sugerencia para utilizar ninguna secuencia particular de las

5 más de novecientas secuencias enumeradas allí para la interferencia de ARN, aparte de la secuencia parcial particular de un gen 4b de proteína corporal multivesicular cargada. Además, la Patente de EE.UU. No. 7,943,819 no proporciona orientación sobre qué otras de las más de novecientas secuencias proporcionadas serían letales, o incluso útiles, en especies de gusanos de la raíz del maíz cuando se utilizan como ARNdc o ARNip. La Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. U.S. 2013/040173 y Publicación de Solicitud PCT No. WO 2013/169923 describen el uso de 10 una secuencia derivada de un gen Snf7 de *Diabrotica virgifera* para la interferencia de ARN en maíz. (También divulgado en Bolognesi et al. (2012) PLoS ONE 7(10): e47534. doi:10.1371/journal.pone.0047534).

El documento WO2007/035650 divulga la alimentación de una o más moléculas de ARN de doble cadena recombinantes para controlar plagas. La reducción de la infestación de plagas se obtiene mediante la supresión de la expresión génica. Específicamente, se divultan 906 supuestas secuencias de ARN como posiblemente útiles para la supresión de la expresión génica en plagas de coleópteros.

15 El documento WO2007/074405 se refiere a métodos para controlar la infestación de plagas utilizando moléculas de ARN de doble cadena. También se divultan métodos para producir plantas transgénicas que expresen las moléculas de ARN de doble cadena. Se divultan secuencias específicas para este propósito. La abrumadora mayoría de secuencias complementarias a los ADN del gusano de la raíz del maíz (tales como las anteriores) no son letales en especies de gusano de la raíz del maíz cuando se utilizan como ARNdc o ARNip. Por ejemplo, Baum et al. (2007, Nature Biotechnology 25:1322-1326), describen los efectos de la inhibición de varias dianas del gen WCR mediante ARNi. Estos autores informaron que 8 de los 26 genes diana que probaron no pudieron proporcionar una mortalidad de plagas de coleópteros significativa desde el punto de vista experimental a una concentración muy alta de ARNi (por ejemplo, ARNdc) de más de 520 ng/cm<sup>2</sup>.

#### Divulgación

20 30 La presente invención es como se define en las reivindicaciones acompañantes. Específicamente, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido ligado operativamente a un promotor que es funcional en una célula vegetal, en el que el polinucleótido codifica una molécula de ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) que inhibe la expresión de un gen endógeno en un gusano de la raíz del maíz occidental (WCR) cuando la molécula de ARNdc es ingerida por el WCR, y, en la que la ingestión de la molécula de ARNdc por el WCR da como resultado la muerte o cese del crecimiento, desarrollo, reproducción, y/o alimentación en el WCR, en la que el polinucleótido comprende al menos una primera secuencia de nucleótidos que es 100 % idéntica a al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 4, el complemento de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, o el complemento de la SEQ ID NO: 5. Además se proporcionan una molécula de ARN en horquilla (ARNhn) que inhibe la expresión de un gen endógeno en un gusano de la raíz del maíz occidental (WCR) cuando la molécula de ARNhn es ingerida por el WCR, una planta transgénica, una célula vegetal, una planta resistente a WCR transgénica, así como 25 35 40 un método para controlar WCR.

45 50 Además se divultan en el presente documento moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, genes diana, ADN, ARNi, ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn) y métodos de uso de los mismos, para el control de plagas de coleópteros, que incluyen, por ejemplo, *D. v. virgifera* LeConte (gusano de la raíz del maíz occidental, "WCR"); *D. barberi* Smith y Lawrence (gusano de la raíz del maíz del norte, "NCR"); *D. u. howardi* Barber (gusano de la raíz del maíz del sur, "SCR"); *D. v. zeae* Krysan y Smith (gusano de la raíz del maíz mexicano, "MCR"); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; *Meligethes aeneus* Fabricius (escarabajo del polen, "PB"). En ejemplos particulares, se divultan moléculas de ácido nucleico de ejemplo que pueden ser homólogas a al menos una porción de una o más secuencias de ácidos nucleicos nativos en una plaga de coleópteros.

55 60 En estos y ejemplos adicionales, la secuencia de ácidos nucleicos nativa puede ser un gen diana, cuyo producto puede estar, por ejemplo y sin limitación: implicado en un proceso metabólico; implicado en un proceso reproductivo; o implicado en el desarrollo larvario. En algunos ejemplos, la inhibición postraduccional de la expresión de un gen diana por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia homóloga a la misma puede ser letal en plagas de coleópteros o dar como resultado un crecimiento y/o reproducción reducidos. En ejemplos específicos, un gen que codifica la polimerasa de ARN II-140 (la proteína codificada se denomina en el presente documento como RNAPII-140, y un ácido nucleico que codifica la RNAPII-140 se denomina en el presente documento rmapII-140), se puede seleccionar como gen diana para el silenciamiento postranscripcional. En ejemplos particulares, un gen diana útil para la inhibición postranscripcional es el nuevo gen denominado en el presente documento rmapII-140. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos de rmapII-140 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 81); el complemento de rmapII-140 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 81); y fragmentos de cualquiera de los anteriores se divultan, por lo tanto, en el presente documento.

5 También se divultan moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es al menos 85 % idéntico a una secuencia de aminoácidos dentro de un producto génico diana (por ejemplo, RNAPII-140, el producto de mapll-140). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es al menos 85 % idéntico a una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, o SEQ ID NO: 82 (RNAPII-140). En ejemplos particulares, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es al menos un 85 % idéntico a una secuencia de aminoácidos dentro de RNAPII-140. Además se divultan moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que es el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido al menos 85 % idéntico a una secuencia de aminoácidos dentro de un producto génico diana.

10 También se divultan secuencias de ADNc de ácidos nucleicos que se pueden utilizar para la producción de moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn) que son complementarias a todo o parte de un gen diana de una plaga de coleópteros, por ejemplo: mapll-140. Los ARNdc, ARNip, ARNmi y/o ARNhn se pueden producir in vitro, 15 o in vivo por un organismo genéticamente modificado, tal como una planta o una bacteria. En ejemplos particulares, se divultan moléculas de ADNc que se pueden utilizar para producir moléculas de ARNi que son complementarias a todo o parte de mapll-140 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 81).

20 Además se divultan medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros y medios para proporcionar resistencia a una plaga de coleópteros a una planta. Ejemplos de medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros incluyen, pero no se limitan a, una molécula de ARN de cadena sencilla o de cadena doble que consiste en al menos una de la SEQ ID NO: 3 (región 1 mapll-140; en este documento a veces se hace referencia como reg1 mapll), SEQ ID NO: 4 (región 2 mapll-140, en el presente documento a veces denominada reg2 mapll), SEQ ID NO: 5 (región 3 mapll-140, en el presente documento a veces denominada reg3 mapll), SEQ ID NO: 77 (región 1 mapll-140; en el presente documento a veces denominada PB reg1 mapll), o el complemento del mismo. Los equivalentes funcionales de medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros incluyen, pero no se limitan a, moléculas de ARN de cadena sencilla o de doble cadena que son sustancialmente homólogas a todo o parte de un gen WCR que comprende la SEQ ID NO: 1. Los equivalentes funcionales de medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros incluyen, pero no se limitan a, moléculas de ARN de cadena sencilla o de doble cadena que son sustancialmente homólogas a todo o parte de un gen PB que comprende la SEQ ID NO: 73. SEQ ID NO: 75, o SEQ ID NO: 81. Un medio para proporcionar resistencia a una plaga de coleópteros a una planta puede ser una molécula de ADN que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un medio para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros ligada operativamente a un promotor, en el que la molécula de ADN es capaz de integrarse en el genoma de una planta de maíz.

35 Se divultan métodos para controlar una población de una plaga de coleópteros, que comprenden proporcionar a una plaga de coleópteros una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn) que funciona al ser absorbida por la plaga de coleópteros para inhibir una función biológica dentro de la plaga de coleópteros, en la que la molécula de ARNi comprende toda o parte de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 81; el complemento de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 81; una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende todo o parte de cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende todo o parte de cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende todo o parte de cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; y el complemento de una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende todo o parte de cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende todo o parte de cualquiera de la SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 81; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende todo o parte de cualquiera de la SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 81; una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende todo o parte de cualquiera de la SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 81; y el complemento de una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende todo o parte de cualquiera de la SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 81.

40 En ejemplos particulares, se divultan métodos para controlar una población de una plaga de coleópteros, que comprenden proporcionar a una plaga de coleópteros una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn) que funciona al ser absorbida por la plaga de coleópteros para inhibir una función biológica dentro de la plaga de coleópteros, en la que la molécula de ARNi comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: todo o parte de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 81; el complemento de todo o parte de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3,

SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, y SEQ ID NO: 81; toda o parte de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; todo o parte del complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; todo o parte de una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; y todo o parte del complemento de una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; toda o parte de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende la SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 81; todo o parte del complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 81; toda o parte de una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende la SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 81; y todo o parte del complemento de una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende la SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 81.

También se divulan en el presente documento métodos en los que se pueden proporcionar ARNdc, ARNip, ARNmi y/o ARNhn a una plaga de coleópteros mediante ensayo de inyección, dieta, pulverización sobre plantas o en células vegetales genéticamente modificadas que expresan los ARNdc, ARNip, ARNmi y/o ARNhn. En estos ejemplos y ejemplos adicionales, los ARNdc, ARNip, ARNmi y/o ARNhn pueden ser ingeridos por larvas y/o adultos de plagas de coleópteros. La ingestión de ARNdc, ARNip, ARNmi y/o ARNhn divulgados en el presente documento puede dar como resultado ARNi en las larvas y/o adultos, lo que a su vez puede dar como resultado el silenciamiento de un gen esencial para la viabilidad de la plaga de coleópteros y conducir en última instancia a la aparición de la mortalidad de larvas y/o adultos. Por lo tanto, se divulan métodos en los que las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la(s) secuencia(s) de ácido nucleico de ejemplo útiles para el control de plagas de coleópteros se proporcionan a una plaga de coleópteros. En ejemplos particulares, la plaga de coleópteros controlada por el uso de moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento puede ser WCR, NCR, SCR o PB. Las características anteriores y otras serán más evidentes a partir de la siguiente Descripción Detallada de varias realizaciones, que procede con referencia a las figuras acompañantes.

#### Breve descripción de los dibujos

Las FIG. 1 y 2 incluyen representaciones de las estrategias utilizadas para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNdc.

#### Listado de secuencia

Las secuencias de ácidos nucleicos enumeradas en el listado de secuencias acompañantes se muestran utilizando abreviaturas de letras estándar para bases de nucleótidos, como se define en 37 C.F.R. § 1.822. Sólo se muestra una cadena de cada secuencia de ácidos nucleicos, pero se entiende que la cadena complementaria y la cadena complementaria inversa están incluidas por cualquier referencia a la cadena presentada. En el listado de secuencia acompañante:

La SEQ ID NO: 1 muestra una secuencia de ADN de rnapII-140 de *Diabrotica*.

La SEQ ID NO: 2 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína RNAPII-140 de *Diabrotica*.

La SEQ ID NO: 3 muestra una secuencia de ADN de *Diabrotica* de la región 1 de rnapII-140 que se utilizó para la síntesis de ARNdc in vitro (no se muestran las secuencias del promotor T7 en los extremos 5' y 3').

La SEQ ID NO: 4 muestra una secuencia de ADN de *Diabrotica* de la región 2 rnapII-140 que se utilizó para la síntesis de ARNdc in vitro (no se muestran las secuencias del promotor T7 en los extremos 5' y 3').

La SEQ ID NO: 5 muestra una secuencia de ADN de *Diabrotica* de la región 3 rnapII-140 que se utilizó para la síntesis de ARNdc in vitro (no se muestran las secuencias del promotor T7 en los extremos 5' y 3').

La SEQ ID NO: 6 muestra una secuencia de ADN de un promotor del fago T7

La SEQ ID NO: 7 muestra una secuencia de ADN de un segmento de la región codificante de YFP que se utilizó para la síntesis de ARNdc in vitro (no se muestran las secuencias del promotor T7 en los extremos 5' y 3').

Las SEQ ID NO: 8 a 15 muestran los cebadores utilizados para amplificar porciones de una secuencia de rnapII-140 que comprende la región 1 rnapII-140, región 2 rnapII-140, y región 3 rnapII-140, y los cebadores utilizados para amplificar un segmento de la región codificante de YFP.

La SEQ ID NO: 16 presenta una secuencia formadora de ARN en horquilla de mapII-140 v1 como se encuentra en pDAB114524. Las bases en mayúsculas son cadena de sentido mapII-140, las bases en minúsculas subrayadas comprenden un intrón ST-LS1, las bases en minúsculas no subrayadas son cadena antisentido mapII-140.

La SEQ ID NO: 17 presenta una secuencia formadora de ARN en horquilla de mapII-140 v2 como se encuentra en pDAB114525. Las bases en mayúsculas son cadena de sentido mapII-140, las bases en minúsculas subrayadas comprenden un intrón ST-LS1, las bases en minúsculas no subrayadas son cadena antisentido mapII-140.

TTCTGCAGTAGAAAGAGGATTTTCAGATCTGTGTTTACCGGTCTT  
ATAAAGACGCCAATCCAAACGTATAGGAGACCAGGAAGAACAAAT  
TCGAAAAAACCGACAAGACAGACGTGCCAGGGCATGAGGAATGCC  
TTTACGATAAATTAGACGACGACgactagtaccgggtggaaaggtaatttctgtcttac  
ctttatatatataataattactaattagtagtaatatagtatttcaagtat  
ttttcaaaaataaaagaatgtatgtatagctattttcaatataactttctaaatataactatgtacccaaaacatgttgtgt  
cgagggttaccccggttagtcgtctgtctaaatattcgtaaagggcatcctatgcctggcacgtctgtctgtcggt  
tttcgaattgttcctcggttcctatacgttggattcggcgcttataagaccgtaaaacacagatctgtaaaaat  
cctcttctactgcagaa

La SEQ ID NO: 18 presenta una secuencia formadora de ARN en horquilla de YFP v2 como se encuentra en pDAB110853. Las bases en mayúsculas son la cadena de sentido YFP, las bases subrayadas comprenden un intrón ST-LS1, las bases en minúsculas y no subrayadas son la cadena antisentido de YFP.

La SEQ ID NO: 19 muestra una secuencia de un intrón ST-LS1

La SEQ ID NO: 20 muestra una secuencia de ADN que codifica una proteína fluorescente amarilla (YFP) como se encuentra en el plásmido pDAB110556.

La SEQ ID NO: 21 muestra una secuencia de ADN de la región 1 de anexina

La SEQ ID NO: 22 muestra una secuencia de ADN de la región 2 de anexina

La SEQ ID NO: 23 muestra una secuencia de ADN de la región 1 de beta espectrina 2.

30 La SEQ ID NO: 24 muestra una secuencia de ADN de la región 2 de beta espestrina 2.

La SEQ ID NO: 25 muestra una secuencia de ADN de la región 1 de mtRR-L4.

La SEQ ID NO: 26 muestra una secuencia de ADN de la región 3 de mtRR-L4.

35 Las SEQ ID NO: 27 a 50 muestran los cebadores utilizados para amplificar regiones genéticas de anexina, beta  
espectrina 2, mtRPL4 o XER para la síntesis de ARNs.

La SEQ ID NC: 51 muestra una secuencia de ADN de maíz que codifica una proteína similar a TIR11.

La SEQ ID NO: 52 muestra una secuencia de ADN del oligonucleótido T20NV.

Las SEQ ID NO: 53 a 57 muestran los cebadores y sondas utilizados para medir los niveles de transcripción en tejidos de maíz.

5 La SEQ ID NO: 58 muestra una secuencia de ADN de una porción de una región codificante de SpecR utilizada para la detección de la estructura principal del vector binario.

10 La SEQ ID NO: 59 muestra una secuencia de ADN de una porción de una región codificante de AAD1 utilizada para el análisis del número de copias genómicas.

La SEQ ID NO: 60 muestra una secuencia de ADN de un gen de invertasa de maíz.

15 Las SEQ ID NO: 61 a 72 muestran secuencias de cebadores y sondas utilizadas para análisis del número de copias de genes y detección de la estructura principal de plásmido de vector binario.

La SEQ ID NO: 73 muestra una secuencia de ADN que comprende RplI140 de *Meligethes aeneus*.

20 La SEQ ID NO: 74 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína RplI140 de *Meligethes aeneus*.

La SEQ ID NO: 75 muestra una secuencia de ADN que comprende RplI140 de *Meligethes aeneus*.

La SEQ ID NO: 76 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína RplI140 de *Meligethes aeneus*.

25 La SEQ ID NO: 77 muestra el reg1 RplI140 utilizado para la producción de ARNdc.

Las SEQ ID NO: 78 y 79 muestran cebadores utilizados para amplificar porciones de una secuencia RplI140 que comprende RplI140 reg1 de *Meligethes aeneus*

30 La SEQ ID NO: 80 muestra una secuencia de aminoácidos de la proteína RplI140 de *Meligethes aeneus*.

La SEQ ID NO: 81 muestra una secuencia de ADN que comprende RplI140 de *Meligethes aeneus*.

La SEQ ID NO: 82 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína RplI140 de *Meligethes aeneus*.

35 Modo(s) para llevar a cabo la invención

I. Resumen de diversas realizaciones

40 En el presente documento se divultan métodos y composiciones para el control genético de infestaciones de plagas de coleópteros. También se proporcionan métodos para identificar uno o más gen(es) esenciales para el ciclo de vida de una plaga de coleópteros para uso como gen diana para el control mediado por ARNi de una población de plagas de coleópteros. Se pueden diseñar vectores plasmídicos de ADN que codifican una o más moléculas de ARNdc, ARNip, ARNmi y/o ARNhn para suprimir uno o más gen(es) diana esenciales para el crecimiento, supervivencia, desarrollo y/o reproducción. También se divultan métodos para la represión postranscripcional de la expresión o inhibición de un gen diana a través de moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una secuencia codificante o no codificante del gen diana en una plaga de coleópteros. En estos ejemplos y ejemplos adicionales, una plaga de coleópteros puede ingerir una o más moléculas de ARNdc, ARNip, ARNmi y/o ARNhn transcritas de todo o una porción de una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia codificante o no codificante de un gen diana, proporcionando esta manera un efecto protector de las plantas.

55 La presente invención proporciona una inhibición específica de secuencia de la expresión de productos génicos diana, utilizando ARNdc, ARNip, ARNmi y/o ARNhn que es complementaria a las secuencias codificantes y/o no codificantes del(los) gen(es) diana para lograr al menos un control parcial de una plaga de coleópteros. De acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico comprende al menos una primera secuencia de nucleótidos que es 100 % idéntica a al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 4, el complemento de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, o el complemento de la SEQ ID NO: 5. Algunas realizaciones implican una célula vegetal transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención. La(s) molécula(s) de ARNi se pueden producir por la célula huésped recombinante y luego ingeridas por una plaga de coleópteros para silenciar o inhibir postranscripcionalmente la expresión de un gen diana en la plaga de coleópteros. Algunas realizaciones implican plantas transgénicas que comprenden dicha célula vegetal transformada. Además de dichas plantas transgénicas, también se divultan plantas de progenie de cualquier generación de plantas transgénicas, semillas transgénicas y productos de plantas transgénicas, cada una de las cuales comprende secuencia(s) de ADN recombinante. Una molécula de ARNi se puede expresar en dicha célula vegetal transgénica. Se puede aislar una molécula de ARNi a partir de una célula vegetal transgénica. La planta transgénica es preferiblemente una planta seleccionada del grupo que comprende maíz (*Zea mays*), soja (*Glycine max*), canola (*Brassica spp.*), y plantas de la familia Poáceas.

Algunas realizaciones implican un método para controlar una población de gusanos de la raíz del maíz occidental que comprende alimentar a los insectos de dicha población con la molécula de ARNhn de la presente invención. Un método para modular la expresión de un gen diana en una célula de plaga de coleópteros puede comprender: (a) transformar una célula vegetal con un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARNi; (b) cultivar la célula vegetal transformada bajo condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo de células vegetales que comprende una pluralidad de células vegetales transformadas; (c) seleccionar una célula vegetal transformada que haya integrado el vector en su genoma; y (d) determinar que la célula vegetal transformada seleccionada comprende la molécula de ARNi codificada por la secuencia de nucleótidos del vector. Una planta se puede regenerar a partir de una célula vegetal que tiene el vector integrado en su genoma y comprende la molécula de ARNi codificada por la secuencia de nucleótidos del vector.

Por lo tanto, también se divulga una planta transgénica resistente al gusano de la raíz del maíz occidental (WCR) que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención. La expresión de la molécula en la planta es suficiente para modular la expresión de un gen diana en una célula de una plaga de coleópteros que contacta con la planta o célula vegetal transformada, por ejemplo, al alimentarse de la planta transformada, una parte de la planta (por ejemplo, raíz) o célula vegetal. Las plantas transgénicas divulgadas en el presente documento muestran resistencia y/o tolerancia potenciada a las infestaciones de plagas de coleópteros. Plantas transgénicas particulares pueden mostrar resistencia y/o tolerancia potenciada a una o más plagas de coleópteros seleccionadas del grupo que consiste en: WCR; NCR; SCR; MCR; D. balteata LeConte; D. u. tenella; D. u. undecimpunctata Mannerheim; y *Meligethes aeneus* Fabricius. De acuerdo con la presente invención, la planta transgénica de la invención es resistente a WCR.

También se divultan en el presente documento métodos para el suministro de agentes de control, tales como una molécula de ARNi, a una plaga de coleópteros. Dichos agentes de control pueden causar, directa o indirectamente, un deterioro en la capacidad de la plaga de coleópteros para alimentarse, crecer o causar daños en un huésped. También se divulga un método que comprende el suministro de una molécula de ARNi estabilizada a una plaga de coleópteros para suprimir al menos un gen diana en la plaga de coleópteros, reduciendo o eliminando esta manera el daño a las plantas causado por una plaga de coleópteros. Un método para inhibir la expresión de un gen diana en una plaga de coleópteros puede dar como resultado el cese del crecimiento, desarrollo, reproducción y/o alimentación en la plaga de coleópteros. El método puede eventualmente provocar la muerte de la plaga de coleópteros.

También se divultan composiciones (por ejemplo, una composición tópica) que comprende una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdc) para uso en o en plantas, animales y/o el entorno de una planta o animal para lograr la eliminación o reducción de una infestación de plagas de coleópteros. La composición puede ser una composición nutricional o una fuente de alimento para alimentar a la plaga de coleópteros. La ingestión de una composición que comprende moléculas de ARNi puede dar como resultado la absorción de las moléculas por una o más células de la plaga de coleópteros, lo que a su vez puede dar como resultado la inhibición de la expresión de al menos un gen diana en la(s) célula(s) de la plaga de coleópteros. La ingestión o daño a una planta o célula vegetal por una plaga de coleópteros se puede limitar o eliminar en o sobre cualquier tejido o entorno huésped en el que la plaga de coleópteros está presente al proporcionar una o más composiciones que comprenden una molécula de ARNi en el huésped de la plaga de coleópteros.

Las composiciones y métodos divulgados en el presente documento se pueden utilizar juntos en combinaciones con otros métodos y composiciones para controlar el daño causado por plagas de coleópteros. Por ejemplo, una molécula de ARNi como se describe en el presente documento para proteger plantas de plagas de coleópteros se puede utilizar en un método que comprende el uso adicional de uno o más agentes químicos eficaces contra una plaga de coleópteros, biopesticidas eficaces contra una plaga de coleópteros, rotación de cultivos o técnicas genéticas recombinantes que exhiben características diferentes de las características de los métodos mediados por ARNi y las composiciones de ARNi (por ejemplo, producción recombinante de proteínas en plantas que son dañinas para una plaga de coleópteros (por ejemplo, toxinas Bt)).

## II. Abreviaturas

|    |       |  |
|----|-------|--|
| 55 | ARNdc | ácido ribonucleico de doble cadena   |
|    | GI    | inhibición de crecimiento  |
|    | NCBI  | Centro Nacional de Información Biotecnológica  |
|    | ADNg  | ADN genómico   |
|    | ARNi  | ácido ribonucleico inhibidor   |
|    | ORF   | marco de lectura abierto   |
| 60 | ARNi  | interferencia del ácido ribonucleico   |
|    | ARNmi | ácido ribonucleico microinhibidor  |
|    | ARNip | ácido ribonucleico inhibidor pequeño   |
|    | ARNhn | ácido ribonucleico en horquilla  |
|    | UTR   | región no traducida  |
| 65 | WCR   | gusano de la raíz del maíz occidental ( <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> LeConte) |
|    | NCR   | gusano de la raíz del maíz del norte ( <i>Diabrotica barberi</i> Smith y Lawrence)     |

|      |   |
|------|---|
| MCR  | gusano de la raíz del maíz mexicano ( <i>Diabrotica virgifera zae</i> Krysan y Smith)   |
| PCR  | Reacción en cadena de la polimerasa   |
| RISC | Complejo silenciador inducido por ARN   |
| SCR  | Gusano de la raíz del maíz del sur ( <i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> Barbero) |
| PB   | Escarabajo del polen ( <i>Meligethes aeneus</i> Fabricio)                               |

5

### III. Términos

10 En la descripción y las tablas que siguen, se utilizan una serie de términos. Para proporcionar una comprensión clara y coherente de la especificación y las reivindicaciones, que incluye el alcance que se les dará a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones:

15 Plaga de coleópteros: En ejemplos particulares, una plaga de coleópteros se selecciona de la lista que comprende *D. v. virgifera* LeConte (WCR); *D. barbieri* Smith y Lawrence (NCR); *D.u. howardi* (CRS); *D. v. zae* (MCR); *D. balteata* LeConte; *D.u. tenella*; *D.u. undecimpunctata* Mannerheim; y *Meligethes aeneus* Fabricio.

20 Contacto (con un organismo): Como se utiliza en el presente documento, el término "contacto con" o "absorción por" un organismo (por ejemplo, una plaga de coleópteros), con respecto a una molécula de ácido nucleico, incluye la internalización de la molécula de ácido nucleico en el organismo, por ejemplo y sin limitación: ingestión de la molécula por el organismo (por ejemplo, mediante alimentación); poner en contacto el organismo con una composición que comprende la molécula de ácido nucleico; y el remojo de organismos con una solución que comprende la molécula de ácido nucleico.

25 Cóntigo: Como se utiliza en el presente documento, el término "cóntigo" se refiere a una secuencia de ADN que se reconstruye a partir de un conjunto de segmentos de ADN superpuestos derivados de una única fuente genética.

Planta de maíz: Como se utiliza en el presente documento, el término "planta de maíz" se refiere a una planta de la especie, *Zea mays* (maíz).

30 Que codifica un ARNi: Como se utiliza en el presente documento, el término "que codifica un ARNi" incluye un gen cuyo producto de transcripción de ARN es capaz de formar una estructura de ARNdc intramolecular (por ejemplo, una horquilla) o estructura de ARNdc intermolecular (por ejemplo, mediante hibridación a una molécula de ARN diana).

35 Expresión: Como se utiliza en el presente documento, "expresión" de una secuencia codificante (por ejemplo, un gen o un transgén) se refiere al proceso mediante el cual se transmite la información codificada de una unidad transcripcional de ácido nucleico (que incluye, por ejemplo, ADN genómico o ADNc) se convierte en una parte operativa, no operativa o estructural de una célula, lo que a menudo incluye la síntesis de una proteína. La expresión génica se puede ver influenciada por señales externas; por ejemplo, exposición de una célula, tejido u organismo a un agente que aumenta o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen también se puede regular en cualquier parte de la ruta que va del ADN al ARN y a la proteína. La regulación de la expresión génica se produce, por ejemplo, mediante controles que actúan sobre transcripción, traducción, transporte y procesamiento del ARN, la degradación de moléculas intermedias tales como ARNm, o a través de la activación, inactivación, compartimentación o degradación de moléculas de proteína específicas una vez que se han producido o por combinaciones de los mismos. La expresión génica se puede medir a nivel de ARN o a nivel de proteína mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, sin limitación, transferencia Northern (ARN), RT-PCR, (inmuno)transferencia Western o ensayo(s) de actividad de proteínas in vitro, in situ, o in vivo.

40 Material genético: Como se utiliza en el presente documento, el término "material genético" incluye todos los genes y moléculas de ácido nucleico, tales como ADN y ARN.

45 50 Inhibición: Como se utiliza en el presente documento, el término "inhibición", cuando se utiliza para describir un efecto sobre una secuencia codificante (por ejemplo, un gen), se refiere a una disminución mensurable en el nivel celular de ARNm transcripto a partir de la secuencia codificante y/o péptido, polipéptido, o producto de proteína de la secuencia codificante. En algunos ejemplos, la expresión de una secuencia codificante se puede inhibir de tal manera que la expresión se elimine aproximadamente. "Inhibición específica" se refiere a la inhibición de una secuencia codificante diana sin afectar en consecuencia la expresión de otras secuencias codificantes (por ejemplo, genes) en la célula en la que se está logrando la inhibición específica.

55 Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o una proteína) ha sido sustancialmente separado, producido o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente se encuentra naturalmente (es decir, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, y proteínas). Las moléculas y proteínas de ácido nucleico que han sido "aisladas" incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas mediante métodos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula huésped, así como moléculas de ácido nucleico, proteínas y péptidos sintetizados químicamente.

Molécula de ácido nucleico: Como se utiliza en el presente documento, el término "molécula de ácido nucleico" se puede referir a una forma polimérica de nucleótidos, que puede incluir cadenas tanto con sentido como antisentido de ARN, ADNc, ADN genómico y formas sintéticas y polímeros mixtos de los anteriores. Un nucleótido se puede referir a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una "molécula de ácido nucleico", como se utiliza en el presente documento, es sinónimo de "ácido nucleico" y "polinucleótido". Una molécula de ácido nucleico suele tener al menos 10 bases en longitud, a menos que se especifique lo contrario. Por convención, la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico se lee desde el extremo 5' hasta el 3' de la molécula. El "complemento" de una secuencia de nucleótidos se refiere a la secuencia, de 5' a 3', de las nucleobases que forman pares de bases con las nucleobases de la secuencia de nucleótidos (es decir, AT/U y G-C). El "complemento inverso" de una secuencia de ácidos nucleicos se refiere a la secuencia, desde 3' hasta 5', de las nucleobases que forman pares de bases con las nucleobases de la secuencia de nucleótidos.

Las "moléculas de ácido nucleico" incluyen formas de cadena sencilla y de cadena doble de ADN; formas de cadena sencilla de ARN; y formas de cadena doble de ARN (ARNdc). El término "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácidos nucleicos" se refiere tanto a las cadenas sentido como antisentido de un ácido nucleico como cadenas sencillas individuales o en dúplex. El término "ácido ribonucleico" (ARN) incluye ARNi (ARN inhibidor), ARNdc (ARN de doble cadena), ARNip (ARN de interferencia pequeña), ARNm (ARN mensajero), ARNmi (microARN), ARNh (ARN en horquilla), ARNt (ARN de transferencia, ya sea cargado o descargado con un aminoácido acilado correspondiente) y ARNc (ARN complementario). ARNi, como se utiliza en el presente documento, se refiere a moléculas de ARN que son capaces de inhibir la expresión de un gen o genes diana e incluye, pero no se limita a, ARNdc, ARNip, ARNmi, ARNh y ARN antisentido. El término "ácido desoxirribonucleico" (ADN) incluye ADNc, ADN genómico e híbridos de ADN-ARN. Los términos "segmento de ácido nucleico" y "segmento de secuencia de nucleótidos", o más generalmente "segmento", se entenderán por aquellos expertos en la técnica como un término funcional que incluye ambas secuencias genómicas, secuencias de ARN ribosomal, secuencias de ARN de transferencia, secuencias de ARN mensajero, secuencias de operones y secuencias de nucleótidos diseñadas más pequeñas que codifican o se pueden adaptar para codificar péptidos, polipéptidos o proteínas.

Oligonucleótido: Un oligonucleótido es un polímero de ácido nucleico corto. Los oligonucleótidos se pueden formar mediante escisión de segmentos de ácido nucleico más largos o al polimerizar precursores de nucleótidos individuales. Los sintetizadores automatizados permiten la síntesis de oligonucleótidos de hasta varios cientos de bases en longitud. Debido a que los oligonucleótidos se pueden unir a una secuencia de nucleótidos complementaria, se pueden utilizar como sondas para detectar ADN o ARN. Los oligonucleótidos compuestos de ADN (oligodesoxirribonucleótidos) se pueden utilizar en PCR, una técnica para la amplificación de secuencias de ADN y ARN (transcripción inversa para producir un ADNc). En la PCR, el oligonucleótido normalmente se denomina como "cebador", lo que permite que una ADN polimerasa extienda el oligonucleótido y replique la cadena complementaria.

Una molécula de ácido nucleico puede incluir uno o ambos nucleótidos de origen natural y modificados ligados entre sí mediante ligamientos de nucleótidos de origen natural y/o no natural. Las moléculas de ácido nucleico se pueden modificar química o bioquímicamente, o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones de internucleótidos (por ejemplo, ligamientos no cargados: por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.; ligamientos cargados: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.; fracciones colgantes: por ejemplo, péptidos; intercaladores: por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.; quelantes; alquilantes; y ligamientos modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). El término "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier conformación topológica, que incluye conformaciones de cadena sencilla, de cadena doble, parcialmente dúplex, tríplex, en horquilla, circular y con candado.

Como se utiliza en el presente documento, con respecto al ADN, el término "secuencia codificante", "secuencia de nucleótidos estructural" o "molécula de ácido nucleico estructural" se refiere a una secuencia de nucleótidos, cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas, que se transcribe para producir ARN (por ejemplo, ARNm o un ARNi) y, en el caso del ARNm, finalmente se traduce en un polipéptido. Con respecto al ARN, el término "secuencia codificante" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se traduce en un péptido, polipéptido o proteína. Los límites de una secuencia codificante están determinados por un codón de inicio de traducción en el extremo 5' y un codón de parada de la traducción en el extremo 3'. Las secuencias codificantes incluyen, pero no se limitan a: ADN genómico; ADNc; EST; y secuencias de nucleótidos recombinantes.

Genoma: Como se utiliza en el presente documento, el término "genoma" se refiere al ADN cromosómico encontrado dentro del núcleo de una célula, y también se refiere al ADN de orgánulos que se encuentra dentro de los componentes subcelulares de la célula. Se puede introducir una molécula de ADN en una célula vegetal de tal manera que la molécula de ADN se integre en el genoma de la célula vegetal. En estos y casos adicionales, la molécula de ADN se puede integrar en el ADN nuclear de la célula vegetal o integrar en el ADN del cloroplasto o la mitocondria de la célula vegetal. El término "genoma", tal como se aplica a las bacterias, se refiere tanto al cromosoma como a los plásmidos dentro de la célula bacteriana. Se puede introducir una molécula de ADN en una bacteria de manera que la molécula de ADN se integre en el genoma de la bacteria. En estos y casos adicionales, la molécula de ADN se puede integrar cromosómicamente o ubicar como o en un plásmido estable.

Identidad de secuencia: El término "identidad de secuencia" o "identidad", como se utiliza en el presente documento, en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptido, se refiere a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación especificada.

5 Como se utiliza en el presente documento, el término "porcentaje de identidad de secuencia" se puede referir al valor determinado comparando dos secuencias óptimamente alineadas (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos) a lo largo de una ventana de comparación, en el que la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni supresiones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula al determinar el número de posiciones en las que aparece el residuo de nucleótido o aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Una secuencia que es idéntica en todas las posiciones en comparación con una secuencia de referencia se dice que es 100 % idéntica a la secuencia de referencia y viceversa.

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

15 The National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST™; Altschul et al. (1990)) está disponible en varias fuentes, que incluyen el Centro Nacional de Información Biotecnológica (Bethesda, MD), y en Internet, para uso en conexión con varios programas de análisis de secuencias. Una descripción de cómo determinar la identidad de la secuencia utilizando este programa está disponible en Internet bajo la sección "ayuda" de BLAST. Para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, se puede emplear la función "secuencias Blast 2" del programa BLAST (Blastn) utilizando la matriz BLOSUM62 predeterminada configurada con parámetros predeterminados. Las secuencias de ácidos nucleicos con una similitud aún mayor con las secuencias de referencia mostrarán un porcentaje de identidad cada vez mayor cuando se evalúen mediante este método.

20 35 Específicamente hibridizable/Específicamente complementario: Como se utilizan en el presente documento, los términos "específicamente hibridable" y "específicamente complementario" son términos que indican un grado suficiente de complementariedad de tal manera que se produzca una unión estable y específica entre la molécula de ácido nucleico y una molécula de ácido nucleico diana. La hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico implica la formación de una alineación antiparalela entre las secuencias de ácidos nucleicos de las dos moléculas de ácido nucleico. Luego, las dos moléculas pueden formar enlaces de hidrógeno con las bases correspondientes en la cadena opuesta para formar una molécula dúplex que, si es suficientemente estable, es detectable utilizando métodos bien conocidos en la técnica. No es necesario que una molécula de ácido nucleico sea 100 % complementaria a su secuencia diana para ser específicamente hibridable. Sin embargo, la cantidad de complementariedad de secuencia que debe existir para que la hibridación sea específica es función de las condiciones de hibridación utilizadas.

25 40 45 55 60 Las condiciones de hibridación que dan como resultado grados particulares de rigurosidad variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación elegido y de la composición y longitud de las secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{Mg}^{++}$ ) de la hibridación determinará la rigurosidad de la hibridación. La fuerza iónica del tampón de lavado y la temperatura de lavado también influyen en la rigurosidad. Los cálculos relacionados con las condiciones de hibridación requeridas para alcanzar grados particulares de rigurosidad son conocidos por los expertos con conocimientos básicos en la técnica y se discuten, por ejemplo, en Sambrook et al. (ed.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9 and 11, y se actualizan; y Hames and Higgins (eds.) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, 1985. Se pueden encontrar instrucciones y orientación más detalladas con respecto a la hibridación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en Tijssen, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part 1, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993; and Ausubel et al., Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995, y actualizaciones.

65 Como se utiliza en el presente documento, "condiciones estrictas" abarcan condiciones bajo las cuales la hibridación se producirá sólo si hay más del 80 % de emparejamiento de secuencia entre la molécula de hibridación y una secuencia homóloga dentro de la molécula de ácido nucleico diana. Las "condiciones estrictas" incluyen niveles particulares de rigor adicionales. Por lo tanto, como se utiliza en el presente documento, las condiciones de "rigurosidad moderada" son aquellas bajo las cuales se hibridarán moléculas con más del 80 % de emparejamiento de secuencia

(menos del 20 % de emparejamiento erróneo); las condiciones de "alta rigurosidad" son aquellas bajo las cuales se hibridarán secuencias con más del 90 % de emparejamiento (menos del 10 % de emparejamiento erróneo); y las condiciones de "muy alta rigurosidad" son aquellas bajo las cuales se hibridarán secuencias con más del 95 % de emparejamiento (menos del 5 % de emparejamiento erróneo).

- 5 Las siguientes son condiciones de hibridación representativas y no limitantes.
- 10 Condición de alta rigurosidad (detecta secuencias que comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia): Hibridación en tampón SSC 5x a 65 °C durante 16 horas; lavar dos veces en tampón 2x SSC a temperatura ambiente durante 15 minutos cada uno; y lavar dos veces en tampón SSC 0.5x a 65 °C durante 20 minutos cada uno.
- 15 Condición de rigurosidad moderada (detecta secuencias que comparten al menos un 80 % de identidad de secuencia): Hibridación en tampón SSC 5x-6x a 65-70 °C durante 16-20 horas; lavar dos veces en tampón 2x SSC a temperatura ambiente durante 5-20 minutos cada uno; y lavar dos veces en 1x tampón SSC a 55-70 °C durante 30 minutos cada uno.
- 20 Condición de control no rigurosa (las secuencias que comparten al menos un 50 % de identidad de secuencia se hibridarán): Hibridación en tampón SSC 6x a temperatura ambiente a 55 °C durante 16-20 horas; lavar al menos dos veces en tampón SSC 2x-3x a temperatura ambiente a 55 °C durante 20-30 minutos cada uno.
- 25 Como se utiliza en el presente documento, el término "sustancialmente homólogo" u "homología sustancial", con respecto a una secuencia de ácidos nucleicos contigua, se refiere a secuencias de nucleótidos contiguas que son portadas por moléculas de ácido nucleico que se hibridan bajo condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de referencia. Por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que tienen secuencias que son sustancialmente homólogas a una secuencia de ácidos nucleicos de referencia de la SEQ ID NO: 1 son aquellas moléculas de ácido nucleico que se hibridan bajo condiciones rigurosas (por ejemplo, las condiciones de Rigurosidad Moderada establecidas, supra) a moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia de ácidos nucleicos de referencia de la SEQ ID NO: 1. Las secuencias sustancialmente homólogas pueden tener al menos un 80 % de identidad de secuencia. Por ejemplo, las secuencias sustancialmente homólogas pueden tener desde aproximadamente 80 % hasta 100 % de identidad de secuencia, tal como 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%;
- 30 aproximadamente 99%; aproximadamente 99.5%; aproximadamente 100%, 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99; o 100%. La propiedad de homología sustancial está estrechamente relacionada con la hibridación específica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico es hibridable específicamente cuando hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del ácido nucleico a secuencias no diana bajo condiciones en las que se desea la unión específica, por ejemplo, bajo condiciones de hibridación rigurosas.
- 35 Como se utiliza en el presente documento, el término "ortólogo" se refiere a un gen en dos o más especies que ha evolucionado a partir de una secuencia de nucleótidos ancestral común y puede conservar la misma función en las dos o más especies.
- 40 Como se utiliza en el presente documento, se dice que dos moléculas de secuencia de ácidos nucleicos exhiben "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una secuencia leída en la dirección 5' a 3' es complementaria a cada nucleótido de la otra secuencia cuando se lee en la dirección 3' a 5'. Una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de referencia exhibirá una secuencia idéntica a la secuencia de complemento inverso de la secuencia de nucleótidos de referencia. Estos términos y descripciones están bien definidos en la técnica y son fácilmente comprendidos por los expertos con conocimientos básicos en la técnica.
- 45 Ligado operativamente: Una primera secuencia de nucleótidos se liga operativamente con una segunda secuencia de ácidos nucleicos cuando la primera secuencia de ácidos nucleicos está en una relación funcional con la segunda secuencia de ácidos nucleicos. Cuando se producen de forma recombinante, las secuencias de ácidos nucleicos ligadas operativamente son generalmente contiguas y, cuando sea necesario, se pueden unir dos regiones codificantes de proteínas en el mismo marco de lectura (por ejemplo, en un ORF fusionado traslacionalmente). Sin embargo, no es necesario que los ácidos nucleicos sean contiguos para estar ligados operativamente.
- 50 El término "ligado operativamente", cuando se utiliza en referencia a una secuencia reguladora y una secuencia codificante, significa que la secuencia reguladora afecta la expresión de la secuencia codificante unida. "Secuencias reguladoras" o "elementos de control" se refieren a secuencias de nucleótidos que influyen en el momento y el nivel/cantidad de transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores; secuencias líderes de traducción; intrones;

5 potenciadores; estructuras de tallo-bucle; secuencias de unión a represores; secuencias de terminación; secuencias de reconocimiento de poliadenilación; etc. Se pueden ubicar secuencias reguladoras particulares en dirección ascendente y/o en dirección descendente de una secuencia codificante ligada operativamente a la misma. También, las secuencias reguladoras particulares ligadas operativamente a una secuencia codificante se pueden ubicar en la cadena complementaria asociada de una molécula de ácido nucleico de doble cadena.

10 Promotor: Como se utiliza en el presente documento, el término "promotor" se refiere a una región de ADN que puede estar en dirección ascendente desde el inicio de la transcripción y que puede estar implicada en el reconocimiento y la unión de la polimerasa de ARN y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un promotor puede estar ligado

15 operativamente a una secuencia codificante para su expresión en una célula, o un promotor puede estar ligado operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal que puede estar ligada operativamente a una secuencia codificante para expresión en una célula. Un "promotor vegetal" puede ser un promotor capaz de iniciar la transcripción en células vegetales. Ejemplos de promotores bajo control del desarrollo

20 incluyen promotores que inician preferentemente la transcripción en ciertos tejidos, tales como hojas, raíces, semillas, fibras, vasos del xilema, traqueidas o esclerénquima. Dichos promotores se denominan "preferidos por tejido". Los

25 promotores que inician la transcripción sólo en ciertos tejidos se denominan "específicos de tejido". Un promotor "específico de tipo celular" impulsa principalmente la expresión en ciertos tipos de células 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. Ejemplos de condiciones ambientales que pueden iniciar la transcripción mediante promotores

30 inducibles incluyen condiciones anaeróbicas y la presencia de luz. Los promotores específicos de tejido, preferidos de tejido, específicos de tipo celular e inducibles constituyen la clase de promotores "no constitutivos". Un promotor "constitutivo" es un promotor que puede ser activo en la mayoría de las condiciones ambientales o en la mayoría de los tipos de tejidos o células.

35 25 Se puede utilizar cualquier promotor inducible de acuerdo con la invención. Véase 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 de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: Promotores del sistema ACEI que responden al cobre; gen *In2* del maíz que responde a los protectores herbicidas de bencenosulfonamida; represor Tet de *Tn10*; y el promotor inducible de un gen de hormona esteroide, cuya actividad transcripcional puede ser inducida por una hormona glucocorticosteroide (Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10421-10425).

40 35 Los promotores constitutivos de ejemplo 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 genes de actina de arroz; promotores de ubiquitina; UEM; MAS; promotor de histonas H3 de maíz; y el promotor de ALS, fragmento 5' de *Xba*I/*Nco*I para el gen estructural de *Brassica napus* ALS3 (o una secuencia de nucleótidos similar a dicho fragmento de *Xba*I/*Nco*I) (Patente de EE.UU. No. 5,659,026).

45 Adicionalmente, se puede utilizar cualquier promotor específico de tejido o preferido de tejido. Las plantas transformadas con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante ligada operativamente a un promotor específico de tejido pueden producir el producto de la secuencia codificante exclusiva, o preferentemente, en un tejido específico. Los promotores de ejemplo específicos de tejido o preferidos de tejido incluyen, pero no se limitan a: Un promotor preferido de la semilla, tal como el del gen de la faseolina; un promotor específico de la hoja e inducido por luz, tal como aquel 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 microsporas tal como el de apg.

50 50 Transformación: Como se utiliza en el presente documento, el término "transformación" o "transducción" se refiere a la transferencia de una o más molécula(s) de ácido nucleico al interior de una célula. Una célula es "transformada" por una molécula de ácido nucleico transducida en la célula cuando la molécula de ácido nucleico se replica de manera estable por la célula, ya sea mediante incorporación de la molécula de ácido nucleico en el genoma celular o mediante replicación episomal. Como se utiliza en el presente documento, el término "transformación" abarca todas las técnicas mediante las cuales se puede introducir una molécula de ácido nucleico 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* 319:791-793); lipofección (Felgner et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417); 55 microinyección (Mueller et al. (1978) *Cell* 15:579-585); transferencia mediada por *Agrobacterium* (Fraley et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-4807); absorción directa de ADN; y bombardeo de microproyectiles (Klein et al. (1987) *Nature* 327:70).

60 60 Transgén: Una secuencia de ácidos nucleicos exógena. En algunos ejemplos, un transgén puede ser una secuencia que codifica una o dos cadena(s) de una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una molécula de ácido nucleico que se encuentra en una plaga de coleópteros. En ejemplos adicionales, un transgén puede ser una secuencia de ácidos nucleicos antisentido, en el que la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos antisentido inhibe la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos diana. En aún ejemplos adicionales, un transgén puede ser una secuencia de genes (por ejemplo, un gen de resistencia a herbicidas), 65 un gen que codifica un compuesto útil industrial o farmacéuticamente, o un gen que codifica un rasgo agrícola

deseable. En estos y otros ejemplos, un transgén puede contener secuencias reguladoras ligadas operativamente a una secuencia codificante del transgén (por ejemplo, un promotor).

5 Vector: Una molécula de ácido nucleico introducida en una célula, por ejemplo, para producir una célula transformada.

Un vector puede incluir secuencias de ácidos nucleicos que le permitan replicarse en la célula huésped, tal como un origen de replicación. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a: un plásmido; cósmido; bacteriófago; o virus que transporta ADN exógeno al interior de una célula. Un vector también puede ser una molécula de ARN. Un vector también puede incluir uno o más genes, secuencias antisentido y/o genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, provocando esta manera que la célula exprese las moléculas de ácido nucleico y/o proteínas codificadas por el vector. Un vector incluye opcionalmente materiales para ayudar a lograr la entrada de la molécula de ácido nucleico en la célula (por ejemplo, un liposoma, un recubrimiento proteico, etc.).

10 Rendimiento: Un rendimiento estabilizado de aproximadamente el 100 % o más en relación con el rendimiento de las variedades de control en el mismo lugar de cultivo, cultivadas al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones. Los términos "rendimiento mejorado" o "rendimiento que mejora" significan un cultivar que tiene un rendimiento estabilizado del 105 % al 115 % o más en relación con el rendimiento de las variedades de control en el mismo lugar de cultivo que contiene densidades significativas de plagas de coleópteros que son perjudiciales para ese cultivo que crece al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones.

15 20 A menos que se indique o implícito específicamente, los términos "un", "uno, una" y "el, la" significan "al menos uno", como se utilizan en este documento.

25 30 A menos que se explique específicamente lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entienden comúnmente aquellos expertos con conocimientos básicos en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar, por ejemplo, en Lewin' s Genes X, Jones & Bartlett Publishers, 2009 (ISBN 10 0763 766321); Krebs et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); and Meyers R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)... Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de la mezcla de solventes son en volumen, a menos que se indique lo contrario. Todas las temperaturas están en grados Celsius.

#### IV. Moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de plagas de coleópteros

##### 35 A. Descripción general

En el presente documento se describen moléculas de ácido nucleico útiles para el control de plagas de coleópteros. Las moléculas de ácido nucleico descritas incluyen secuencias diana (por ejemplo, genes nativos y secuencias no codificantes), ARNdc, ARNip, ARNhn y ARNmi. Por ejemplo, se describen moléculas de ARNdc, ARNip, ARNmi y/o ARNhn que pueden ser específicamente complementarias a todo o parte de una o más secuencias de ácidos nucleicos nativos en una plaga de coleópteros. En estos y ejemplos adicionales, la(s) secuencia(s) de ácido nucleico nativo pueden ser uno o más gen(es) diana, cuyo producto puede estar, por ejemplo y sin limitación: implicado en un proceso metabólico; implicado en un proceso reproductivo; o implicado en el desarrollo larvario. Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento, cuando se introducen en una célula que comprende al menos una(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos nativo con las que las moléculas de ácido nucleico son específicamente complementarias, pueden iniciar ARNi en la célula y, en consecuencia, reducir o eliminar la expresión de las secuencia(s) de ácido nucleico nativo. En algunos ejemplos, la reducción o eliminación de la expresión de un gen diana mediante una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia específicamente complementaria de la misma puede ser letal en plagas de coleópteros o dar como resultado un crecimiento y/o reproducción reducidos.

50 55 50 Se puede seleccionar al menos un gen diana en una plaga de coleópteros, en el que el gen diana comprende una secuencia de nucleótidos que comprende mapll-140 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 o SEQ ID NO: 81). En ejemplos particulares, se selecciona un gen diana en una plaga de coleópteros, en el que el gen diana comprende una nueva secuencia de nucleótidos que comprende mapll-140 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 o SEQ ID NO: 81).

60 65 60 Un gen diana puede ser una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos 85 % idéntica (por ejemplo, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 100 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica) a la secuencia de aminoácidos de RNAPII-140 (por ejemplo SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, o SEQ ID NO: 82). Un gen diana puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos en una plaga de coleópteros, cuya inhibición postranscripcional tiene un efecto perjudicial sobre la plaga de coleópteros, o proporciona un beneficio protector contra la plaga de coleópteros a una planta. En ejemplos particulares, un gen diana es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos 85 %

5 idéntica, aproximadamente 90 % idéntica, aproximadamente 95 % idéntica, aproximadamente 96 % idéntica, aproximadamente 97 % idéntica, aproximadamente 98 % idéntica, aproximadamente 99 % idéntica, aproximadamente 100 % idéntica, 85 % idéntica, 86 % idéntica, 87 % idéntica, 88 % idéntica, 89 % idéntica, 90 % idéntica, 91 % idéntica, 92 % idéntica, 93 % idéntica, 94 % idéntica, 95 % idéntica, 96 % idéntica, 97 % idéntica, 98 % idéntica, 99 % idéntica, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, o SEQ ID NO: 82.

10 En el presente documento se proporcionan secuencias de nucleótidos, cuya expresión da como resultado una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que es específicamente complementaria a todo o parte de una molécula de ARN nativa que está codificada por una secuencia codificante en una plaga de coleópteros. En algunos ejemplos, después de ingestión de la molécula de ARN expresada por una plaga de coleópteros, se puede obtener una regulación a la baja de la secuencia codificante en células de la plaga de coleópteros. La regulación a la baja de la secuencia codificante en células de la plaga de coleópteros puede dar como resultado un efecto perjudicial sobre el crecimiento, viabilidad, proliferación y/o reproducción de la plaga de coleópteros.

15 15 Las secuencias diana pueden incluir secuencias de ARN no codificantes transcritas, tales como 5'UTR; 3'UTR; secuencias líderes empalmadas; secuencias de intrones; secuencias outrón (por ejemplo, ARN 5'UTR modificado posteriormente en corte y empalme trans); secuencias donatrón (por ejemplo, ARN no codificante necesario para proporcionar secuencias donantes para el corte y empalme trans); y otros ARN transcritos no codificantes de genes de plagas de coleópteros diana. Dichas secuencias se pueden derivar de genes tanto monocistrónicos como policistrónicos.

20 25 Por lo tanto, también se describen en el presente documento moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn) que comprenden al menos una secuencia de nucleótidos que es específicamente complementaria a toda o parte de una secuencia diana en una plaga de coleópteros. Una molécula de ARNi puede comprender secuencia(s) de nucleótidos que son complementarias a la totalidad o parte de una pluralidad de secuencias diana; por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más secuencias diana. Se puede producir una molécula de ARNi *in vitro*, o *in vivo* por un organismo genéticamente modificado, tal como una planta o una bacteria. También se divultan secuencias de ADNc que se pueden utilizar para la producción de moléculas de ARNdc, moléculas de ARNip, moléculas de ARNmi y/o ARNhn que son específicamente complementarias a toda o parte de una secuencia diana en una plaga de coleópteros. 30 35 Se describen además construcciones de ADN recombinante para uso para lograr una transformación estable de dianas huésped particulares. Las dianas huésped transformadas pueden expresar niveles eficaces de moléculas de ARNdc, ARNip, ARNmi y/o ARNhn a partir de construcciones de ADN recombinante. Por lo tanto, también se describe un vector de transformación de plantas que comprende al menos una secuencia de nucleótidos ligada operativamente a un promotor heterólogo funcional en una célula vegetal, en la que la expresión de la(s) secuencia(s) de nucleótidos da como resultado una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que es específicamente complementaria a toda o parte de una secuencia diana en una plaga de coleópteros.

40 45 Las moléculas de ácido nucleico útiles para el control de plagas de coleópteros pueden incluir: toda o parte de una secuencia de ácidos nucleicos nativa aislada de *Diabrotica* que comprende rnapll-140 (SEQ ID NO: 1); toda o parte de una secuencia de ácidos nucleicos nativa aislada de *Meligethes* que comprende rnapll-140 (por ejemplo, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 o SEQ ID NO: 81); secuencias de nucleótidos que cuando se expresan dan como resultado una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que es específicamente complementaria a todo o parte de una molécula de ARN nativa que está codificada por rnapll-140 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 o SEQ ID NO: 81); moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn) que comprenden al menos una secuencia de nucleótidos que es específicamente complementaria a todo o parte de mapll-140 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 o SEQ ID NO: 81); secuencias de ADNc que se pueden utilizar para la producción de moléculas de ARNdc, moléculas de ARNip, moléculas de ARNmi y/o ARNhn que son específicamente complementarias a todo o parte de rnapll-140 (por ejemplo, 50 55 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 o SEQ ID NO: 81); y construcciones de ADN recombinante para uso para lograr una transformación estable de dianas huésped particulares, en las que una diana huésped transformada comprende una o más de las moléculas de ácido nucleico anteriores.

55 La presente invención proporciona específicamente una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.

#### B. Moléculas de ácido nucleico

60 Se divultan ARNi (por ejemplo, ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn) moléculas que inhiben la expresión de genes diana en una célula, tejido u órgano de una plaga de coleópteros; y moléculas de ADN capaces de expresarse como una molécula de ARNi en una célula o microorganismo para inhibir la expresión de genes diana en una célula, tejido u órgano de una plaga de coleópteros.

65 La presente invención proporciona específicamente una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1. Además se divultan moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden al menos una (por ejemplo, una, dos, tres o más) secuencia(s) de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75,

77, o 81; el complemento de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, *WCR*) que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; el complemento de una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* (por ejemplo, *PB*) que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; el complemento de una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81. El contacto con o la absorción por parte de una plaga de coleópteros de la secuencia de ácidos nucleicos aislada inhibe el crecimiento, desarrollo, reproducción y/o alimentación de la plaga de coleópteros.

Una molécula de ácido nucleico puede comprender al menos una (por ejemplo, una, dos, tres o más) secuencia(s) de ADN capaces de expresarse como una molécula de ARNi en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen diana en una célula, tejido u órgano de una plaga de coleópteros. Dicha(s) secuencia(s) de ADN se pueden ligar operativamente a una secuencia promotora que funciona en una célula que comprende la molécula de ADN para iniciar o potenciar la transcripción del ARN codificado capaz de formar una(s) molécula(s) de ARNdc. La al menos una (por ejemplo, una, dos, tres o más) secuencia(s) de ADN se pueden derivar de una secuencia de nucleótidos que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81. Derivados de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81 incluyen fragmentos de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81. Dicho fragmento puede comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81, o un complemento de los mismos. Por tanto, dicho fragmento puede comprender, por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos contiguos de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81, o un complemento de los mismos. En estos y casos adicionales, dicho fragmento puede comprender, por ejemplo, más de aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81, o un complemento de los mismos. Por lo tanto, un fragmento de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81 pueden comprender, por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, aproximadamente 25 (por ejemplo, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, y 29), 30, aproximadamente 30, 40, aproximadamente 40 (por ejemplo, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, y 45), 50, aproximadamente 50, 60, aproximadamente 60, 70, aproximadamente 70, 80, aproximadamente 80, 90, aproximadamente 90, 100, aproximadamente 100, 110, aproximadamente 110, 120, aproximadamente 120, 130, aproximadamente 130, 140, aproximadamente 140, 150, aproximadamente 150, 160, aproximadamente 160, 170, aproximadamente 170, 180, aproximadamente 180, 190, aproximadamente 190, 200, aproximadamente 200 o más nucleótidos contiguos de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81 o un complemento de los mismos.

Se pueden introducir moléculas de ARNi parcial o totalmente estabilizadas en una plaga de coleópteros para inhibir la expresión de un gen diana en una célula, tejido u órgano de la plaga de coleópteros. Cuando se expresa como una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn) y se absorbe por una plaga de coleópteros, secuencias de ácidos nucleicos que comprenden uno o más fragmentos de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81 pueden causar una o más muertes, inhibición del crecimiento, cambios en la relación de sexos, reducción del tamaño de la cría, cese de la infección y/o cese de la alimentación por parte de una plaga de coleópteros. Por ejemplo, se divulga una molécula de ARNi que comprende una secuencia de nucleótidos que incluye de aproximadamente 15 a aproximadamente 300 nucleótidos que son sustancialmente homólogas a una secuencia de gen diana de una plaga de coleópteros y que comprende uno o más fragmentos de una secuencia de nucleótidos que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81. La expresión de dicha molécula de ARNdc puede, por ejemplo, conducir a la mortalidad y/o a la inhibición del crecimiento en una plaga de coleópteros que absorbe la molécula de ARNi.

Las moléculas de ARNi proporcionadas en el presente documento pueden comprender secuencias de nucleótidos complementarias a un gen diana que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81 y/o secuencias de nucleótidos complementarias a un fragmento de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81, cuya inhibición del gen diana en una plaga de coleópteros da como resultado la reducción o eliminación de una proteína o agente de secuencia de nucleótidos que es esencial para el crecimiento y desarrollo. u otra función biológica de la plaga de coleópteros. Una secuencia de nucleótidos seleccionada puede exhibir de aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81, un fragmento contiguo de la secuencia de nucleótidos establecida en las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81, o el complemento de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos seleccionada puede presentar 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%; aproximadamente 100%, 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99; o 100 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81, un fragmento contiguo de la secuencia de nucleótidos establecida en las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81, o el complemento de cualquiera de los anteriores.

Una molécula de ADN capaz de expresarse para producir una molécula de ARNi en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen diana puede comprender una única secuencia de nucleótidos que es específicamente complementaria a toda o parte de una secuencia de ácidos nucleicos nativa encontrada en una o más especies de plagas de coleópteros diana, o la molécula de ADN se puede construir como una quimera a partir de una pluralidad de dichas secuencias específicamente complementarias.

Una molécula de ácido nucleico puede comprender una primera y una segunda secuencia de nucleótidos separadas por una "secuencia separadora". Una secuencia separadora puede ser una región que comprende cualquier secuencia de nucleótidos que facilite la formación de una estructura secundaria entre la primera y la segunda secuencia de nucleótidos, cuando esto se deseé. La secuencia separadora puede ser parte de una secuencia codificante sentido o antisentido para ARNm. La secuencia separadora puede comprender alternativamente cualquier combinación de nucleótidos u homólogos de los mismos que sean capaces de ligarse covalentemente a una molécula de ácido nucleico.

Por ejemplo, la molécula de ADN puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una o más moléculas de ARN diferentes, en la que cada una de las diferentes moléculas de ARN comprende una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos, en la que la primera y segunda secuencias de nucleótidos son complementarias entre sí. La primera y segunda secuencias de nucleótidos pueden estar conectadas dentro de una molécula de ARN mediante una secuencia separadora. La secuencia separadora puede constituir parte de la primera secuencia de nucleótidos o de la segunda secuencia de nucleótidos. La expresión de una molécula de ARN que comprende la primera y segunda secuencias de nucleótidos puede conducir a la formación de una molécula de ARNdc y/o ARNh, mediante emparejamiento de bases específico de la primera y segunda secuencias de nucleótidos. La primera secuencia de nucleótidos o la segunda secuencia de nucleótidos pueden ser sustancialmente idénticas o complementarias a una secuencia de ácidos nucleicos nativa de una plaga de coleópteros (por ejemplo, un gen diana, o una secuencia no codificante transcrita), un derivado de la misma, o una secuencia complementaria de la misma.

Las moléculas de ácido nucleico de ARNdc comprenden dobles cadenas de secuencias de ribonucleótidos polimerizados y pueden incluir modificaciones en la cadena principal de fosfato-azúcar o en el nucleósido. Las modificaciones en la estructura del ARN se pueden adaptar para permitir una inhibición específica. Las respectivas moléculas de ARNdc se pueden modificar a través de un proceso enzimático ubicuo de tal manera que se puedan generar moléculas de ARNip. Este proceso enzimático puede utilizar una enzima ARNasa III, tal como DICER en eucariotas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Véase Elbashir et al. (2001) *Nature* 411:494-498; and Hamilton and Baulcombe (1999) *Science* 286(5441):950-952. El DICER o enzimas ARNasa III funcionalmente equivalentes escinden cadenas más grandes de ARNdc y/o moléculas de ARNh en oligonucleótidos más pequeños (por ejemplo, ARNip), cada uno de los cuales tiene aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud. Las moléculas de ARNip producidas por estas enzimas tienen salientes 3' de 2 a 3 nucleótidos y extremos 5' fosfato y 3' hidroxilo. Las moléculas de ARNip generadas por las enzimas ARNasa III se desenrollan y separan en ARN de cadena sencilla en la célula. Luego, las moléculas de ARNip se hibridan específicamente con secuencias de ARN transcritas de un gen diana, y ambas moléculas de ARN se degradan posteriormente mediante un mecanismo celular inherente de degradación del ARN. Este proceso puede dar como resultado la degradación o eliminación efectiva de la secuencia de ARN codificada por el gen diana en el organismo diana. El resultado es el silenciamiento postranscripcional del gen diana. En algunos ejemplos, las moléculas de ARNip producidas por enzimas ARNasa III endógenas a partir de moléculas de ácido nucleico heterólogas pueden mediar eficazmente en la regulación a la baja de genes diana en plagas de coleópteros.

Una molécula de ácido nucleico puede incluir al menos una secuencia de nucleótidos de origen no natural que se puede transcribir para producir una molécula de ARN de cadena sencilla capaz de formar una molécula de ARNdc *in vivo* a través de hibridación intermolecular. Dichas secuencias de ARNdc normalmente se autoensamblan y pueden proporcionarse en la fuente de nutrición de una plaga de coleópteros para lograr la inhibición postranscripcional de un

gen diana. En estos y casos adicionales, una molécula de ácido nucleico puede comprender dos secuencias de nucleótidos diferentes que no se producen de forma natural, cada una de las cuales es específicamente complementaria a un gen diana diferente en una plaga de coleópteros. Cuando se proporciona dicha molécula de ácido nucleico a una plaga de coleópteros, la molécula inhibe la expresión de al menos dos genes diana diferentes en la plaga de coleópteros.

5 C. Obtención de moléculas de ácido nucleico

10 Se puede utilizar una variedad de secuencias nativas en plagas de coleópteros como secuencias diana para el diseño de moléculas de ácido nucleico, tales como ARNi y moléculas de ADN que codifican ARNi. Sin embargo, la selección de secuencias nativas no es un proceso sencillo. Sólo un pequeño número de secuencias nativas de la plaga de coleópteros serán dianas eficaces. Por ejemplo, no se puede predecir con certeza si una secuencia nativa particular puede ser regulada a la baja de manera efectiva por moléculas de ácido nucleico, o si la regulación a la baja de una secuencia nativa particular tendrá un efecto perjudicial sobre el crecimiento, viabilidad, proliferación y/o reproducción de la plaga de coleópteros. La gran mayoría de las secuencias de plagas de coleópteros nativos, tales como las EST aisladas de ellas (por ejemplo, como se enumeran en Patente de EE.UU. No. 7,612,194 y Patente de EE. UU. No. 7,943,819), no tienen un efecto perjudicial sobre el crecimiento, viabilidad, proliferación y/o reproducción de la plaga de coleópteros, tal como WCR o NCR. Tampoco es predecible cuáles de las secuencias nativas que pueden tener un efecto perjudicial sobre una plaga de coleópteros se pueden utilizar en técnicas recombinantes para expresar moléculas de ácido nucleico complementarias a dichas secuencias nativas en una planta huésped y proporcionar el efecto perjudicial sobre la plaga de coleópteros, al alimentarse sin causar daño a la planta huésped.

15 Las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, Las moléculas de ARNi que se proporcionarán en la planta huésped de una plaga de coleópteros) se pueden seleccionar para dirigirse a secuencias de ADNc que codifican proteínas o partes de proteínas esenciales para la supervivencia de la plaga de coleópteros, tales como secuencias de aminoácidos implicadas en rutas bioquímicas metabólicas o catabólicas, división celular, reproducción, metabolismo energético, digestión, reconocimiento de la planta huésped y similares. Como se describe en el presente documento, la ingestión de composiciones por un organismo diana que contiene uno o más ARNi, de los cuales al menos un segmento es específicamente complementario de al menos un segmento sustancialmente idéntico de ARN producido en las células 20 del organismo de plaga diana, puede provocar la muerte u otra inhibición de la diana. Se puede utilizar una secuencia de nucleótidos, ya sea ADN o ARN, derivada de una plaga de coleópteros para construir células vegetales resistentes a la infestación por plagas de coleópteros. La planta huésped de la plaga de coleópteros (por ejemplo, Z. mays o G. max), por ejemplo, se puede transformar para contener una o más de las secuencias de nucleótidos derivadas de la plaga de coleópteros como se proporciona en el presente documento. La secuencia de nucleótidos transformada en 25 el huésped puede codificar uno o más ARNi que contienen o se forman en una secuencia de ARNdc en las células o fluidos biológicos dentro del huésped transformado, haciendo esta manera que el ARNdc esté disponible si/cuando la plaga de coleópteros forme una relación nutricional con el huésped transgénico. Esto puede dar como resultado la supresión de la expresión de uno o más genes en las células de la plaga de coleópteros y, en última instancia, la muerte o inhibición de su crecimiento o desarrollo.

30 40 Por lo tanto, se puede dirigir un gen que esté esencialmente implicado en el crecimiento, desarrollo y reproducción de una plaga de coleópteros. Otros genes diana pueden incluir, por ejemplo, aquellos que desempeñan funciones importantes en la viabilidad, movimiento, migración, crecimiento, desarrollo, infectividad, establecimiento de sitios de alimentación y reproducción de las plagas de coleópteros. Por lo tanto, un gen diana puede ser un gen constitutivo o 45 un factor de transcripción. Adicionalmente, una secuencia de nucleótidos de plaga de coleópteros nativa para uso como se describe en el presente documento también se puede derivar de un homólogo (por ejemplo, un ortólogo), de un gen vegetal, viral, bacteriano o de insecto, cuya función es conocida por aquellos expertos en la técnica, y cuya secuencia de nucleótidos es específicamente hibridable con un gen diana en el genoma de la plaga de coleópteros diana. Aquellos expertos en la técnica conocen métodos para identificar un homólogo de un gen con una secuencia 50 de nucleótidos conocida mediante hibridación.

55 También se divulan en el presente documento métodos para obtener una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos para producir un ARNi (por ejemplo, Molécula de ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn. Uno de esos métodos comprende: (a) analizar uno o más gen(es) diana para determinar su expresión, función y fenotipo tras la supresión génica mediada por ARNi en una plaga de coleópteros; (b) sondear una biblioteca de ADNc o ADNg con una sonda que comprende toda o una porción de una secuencia de nucleótidos o un homólogo de la misma de una plaga de coleópteros diana que muestra una (por ejemplo, reducido) fenotipo de crecimiento o desarrollo en un análisis de supresión mediado por ARNi; (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 ADNc o fragmento de ADNg que comprende el clon aislado en la etapa (d), en la que la molécula de ácido nucleico secuenciada comprende toda o una porción sustancial de la secuencia de ARN o un homólogo de la misma; y (f) sintetizar químicamente toda o una porción sustancial de una secuencia de genes, o un ARNip o ARNmi o ARNhn o ARNm o ARNdc.

60 65 Un método para obtener un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos para producir una porción sustancial de una molécula ARNi (por ejemplo, de ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn) puede incluir: (a) sintetizar primer y segundo cebadores oligonucleotídicos específicamente complementarios a una porción de una

secuencia de nucleótidos nativa de una plaga de coleópteros diana; y (b) amplificar un inserto de ADNc o ADNg presente en un vector de clonación utilizando el primer y segundo cebadores oligonucleotídicos de la etapa (a), en la que la molécula de ácido nucleico amplificada comprende una porción sustancial de una molécula de ARNip o ARNmi o ARNhn o ARNm o ARNdc.

- 5 Los ácidos nucleicos se pueden aislar, amplificar o producir mediante varios enfoques. Por ejemplo, una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn) se puede obtener mediante amplificación por PCR de una secuencia de ácidos nucleicos diana (por ejemplo, un gen diana o una secuencia no codificante transcrita diana) derivada de una biblioteca de ADNg o ADNc, o porciones de la misma. Se puede extraer ADN o ARN de un organismo diana y se pueden preparar bibliotecas de ácidos nucleicos a partir de los mismos utilizando métodos conocidos por aquellos expertos con conocimientos básicos en la técnica. Se pueden utilizar bibliotecas de ADNg o ADNc generadas a partir de un organismo diana para la amplificación por PCR y la secuenciación de genes diana. Un producto de PCR confirmado se puede utilizar como plantilla para transcripción in vitro para generar ARN sentido y antisentido con promotores mínimos. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico se pueden sintetizar mediante cualquiera de una serie de técnicas (Véase, por ejemplo, Ozaki et al. (1992) Nucleic Acids Research, 20: 5205-5214; and Agrawal et al. (1990) Nucleic Acids Research, 18: 5419-5423), que incluye el uso de un sintetizador de ADN automatizado (por ejemplo, un sintetizador de ADN/ARN modelo 392 o 394 de P.E. Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.), utilizando químicas estándar, tales como química de fosforamidita. Véase, por ejemplo, Beaucage et al. (1992) Tetrahedron, 48: 2223-2311; Patentes de EE. UU. Nos. 4,415,732, 4,458,066, 4,725,677, 4,973,679, y 4,980,460. También se pueden emplear químicas alternativas que dan como resultado grupos de estructura principal no naturales, tales como fosforotioato, fosforamidato y similares.
- 10 Un experto en la técnica puede producir química o enzimáticamente una molécula de ARN, ARNdc, ARNip, ARNmi o ARNhn mediante reacciones manuales o automatizadas, o in vivo en una célula que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica la molécula de ARN, ARNdc, ARNip, ARNmi o ARNhn. El ARN también se puede producir mediante síntesis orgánica parcial o total, cualquier ribonucleótido modificado se puede introducir mediante síntesis enzimática u orgánica in vitro. Una molécula de ARN se puede sintetizar por una polimerasa de ARN celular o una polimerasa de ARN de bacteriófago (por ejemplo, polimerasa de ARN T3, polimerasa de ARN T7 y polimerasa de ARN SP6). En la técnica se conocen construcciones de expresión útiles para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos. Véase, por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nos. 5,593,874, 5,693,512, 5,698,425, 5,712,135, 5,789,214, y 5,804,693. Las moléculas de ARN que se sintetizan químicamente o por síntesis enzimática in vitro se pueden purificar antes de su introducción en una célula. Por ejemplo, las moléculas de ARN se pueden purificar a partir de una mezcla mediante extracción con un solvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía o una combinación de las mismas. Alternativamente, las moléculas de ARN que se sintetizan químicamente o por síntesis enzimática in vitro se puede utilizar sin purificación o con una purificación mínima, por ejemplo, para evitar pérdidas debido al procesamiento de muestras. Las moléculas de ARN se pueden secar para su almacenamiento o disolverse en una solución acuosa. La solución puede contener tampones o sales para promover la hibridación y/o la estabilización de las cadenas dúplex de moléculas de ARNdc.
- 15 Una molécula de ARNdc puede estar formada por una única cadena de ARN autocomplementaria o por dos cadenas de ARN complementarias. Las moléculas de ARNdc se pueden sintetizar in vivo o in vitro. Una polimerasa de ARN endógena de la célula puede mediar en la transcripción de una o dos cadenas de ARN in vivo, o se puede utilizar polimerasa de ARN clonada para mediar en la transcripción in vivo o in vitro. La inhibición postranscripcional de un gen diana en una plaga de coleópteros puede estar dirigida al huésped mediante la transcripción específica en un órgano, tejido o tipo de célula del huésped, por ejemplo, mediante el uso de un promotor específico de tejido; estimulación de una condición ambiental en el huésped (por ejemplo, mediante el uso de un promotor inducible que responde a infección, estrés, temperatura y/o inductores químicos); y/o transcripción de ingeniería en un estadio de desarrollo o edad del huésped (por ejemplo, mediante el uso de un promotor específico de la etapa de desarrollo). Las cadenas de ARN que forman una molécula de ARNdc, ya sea transcritas in vitro o in vivo, puede estar o no poliadeniladas, y pueden o no ser capaces de traducirse en un polipéptido mediante el aparato de traducción de una célula.

#### D. Vectores recombinantes y transformación de la célula huésped

- 20 se divulga una molécula de ADN para introducción en una célula (por ejemplo, una célula bacteriana, una célula de levadura o una célula vegetal), en la que la molécula de ADN comprende una secuencia de nucleótidos que, tras la expresión en ARN y la ingestión por una plaga de coleópteros, logra la supresión de un gen diana en una célula, tejido o Órgano de la plaga de coleópteros. Por lo tanto, se divulga una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos capaz de expresarse para producir una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn) en una célula vegetal para inhibir la expresión de genes diana en una plaga de coleópteros. Para iniciar o mejorar la expresión, dichas moléculas de ácido nucleico recombinantes pueden comprender una o más secuencias reguladoras, cuyas secuencias reguladoras se pueden ligar operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos capaz de expresarse para producir un ARNi. Se conocen métodos para expresar una molécula de supresión génica en plantas y se pueden utilizar para expresar una secuencia de nucleótidos. Véase, por ejemplo, Publicación Internacional PCT No. WO06/073727; y Publicación de Patente de EE. UU. No. 2006/0200878 A1).

- En casos específicos, una molécula de ADN recombinante puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una molécula de ARNdc. Dichas moléculas de ADN recombinante pueden codificar moléculas de ARNdc capaces de inhibir la expresión de gen(es) diana endógenos en una célula de plaga de coleópteros tras su ingestión.
- 5 Un ARN transcripto puede formar una molécula de ARNdc que puede proporcionarse en forma estabilizada; por ejemplo, como estructura de horquilla y de tallo y bucle.
- En estos y casos adicionales, una cadena de una molécula de ARNdc se puede formar mediante transcripción a partir de una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente homóloga a una secuencia de nucleótidos que consiste en SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77 o 81; el complemento de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81; una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; el complemento de una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5; una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; el complemento de una secuencia nativa no codificante de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe para producir una molécula de ARN nativa que comprende las SEQ ID NO: 73, 75, 77, o 81.
- 40 Una molécula de ADN recombinante que codifica una molécula de ARNdc puede comprender al menos dos segmentos de secuencia de nucleótidos dentro de una secuencia transcrita, dichas secuencias dispuestas de manera que la secuencia transcrita comprenda un primer segmento de secuencia de nucleótidos en una orientación con sentido, y un segundo segmento de secuencia de nucleótidos (que comprende el complemento del primer segmento de secuencia de nucleótidos) está en una orientación antisentido, con respecto a al menos un promotor, en el que el segmento de secuencia de nucleótidos con sentido y el segmento de secuencia de nucleótidos antisentido están unidos o conectados por un segmento de secuencia separadora de aproximadamente cinco (~5) a alrededor de mil (~1000) nucleótidos. El segmento de secuencia separadora puede formar un bucle entre los segmentos de secuencia sentido y antisentido. El segmento de secuencia de nucleótidos con sentido o el segmento de secuencia de nucleótidos antisentido puede ser sustancialmente homólogo a la secuencia de nucleótidos de un gen diana (por ejemplo, un gen que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81) o fragmento del mismo. Sin embargo, en algunos casos, una molécula de ADN recombinante puede codificar una molécula de ARNdc sin una secuencia separadora. En algunos ejemplos, una secuencia codificante con sentido y una secuencia codificante antisentido pueden tener longitudes diferentes.
- 55 Las secuencias identificadas por tener un efecto nocivo sobre plagas de coleópteros o un efecto protector de plantas con respecto a plagas de coleópteros se pueden incorporar fácilmente en moléculas de ARN expresadas mediante la creación de casetes de expresión apropiados en una molécula de ácido nucleico recombinante. Por ejemplo, dichas secuencias se pueden expresar como una horquilla con estructura de tallo y bucle al tomar un primer segmento correspondiente a una secuencia de gen diana (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81 y fragmentos de los mismos); ligar esta secuencia a una región separadora del segundo segmento que no es homóloga ni complementaria al primer segmento; y ligar éste a un tercer segmento, en el que al menos una porción del tercer segmento es sustancialmente complementaria al primer segmento. Dicha construcción forma una estructura de tallo y bucle mediante emparejamiento de bases intramoleculares del primer segmento con el tercer segmento, en el que la estructura de bucle forma y comprende el segundo segmento. Véase, por ejemplo, Publicaciones de Patentes de EE. UU. Nos. 2002/0048814 y 2003/0018993; y Publicaciones PCT Internacionales Nos. WO94/01550 y WO98/05770. Una molécula de ARNdc se puede generar, por ejemplo, en forma de una estructura de cadena doble, tal como una

estructura de tallo-bucle (por ejemplo, horquilla), mediante el cual la producción de ARNip dirigido a una secuencia de plaga de coleópteros nativos se potencia mediante la coexpresión de un fragmento del gen diana, por ejemplo en un casete expresable de planta adicional, que conduce a una producción mejorada de ARNip, o reduce la metilación para prevenir el silenciamiento génico transcripcional del promotor de horquilla ARNdc.

5 También se divulga la introducción de una molécula de ácido nucleico recombinante en una planta (es decir, transformación) para lograr niveles de expresión inhibidores de plagas de coleópteros de una o más moléculas de ARNi. Una molécula de ADN recombinante puede ser, por ejemplo, un vector, tal como un plásmido lineal o circular cerrado. El sistema de vector puede ser un único vector o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos que juntos 10 contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de un huésped. Además, un vector puede ser un vector de expresión. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden, por ejemplo, insertarse adecuadamente en un vector bajo el control de un promotor adecuado que funciona en uno o más huéspedes para impulsar la expresión de una secuencia codificante ligada u otra secuencia de ADN. Hay muchos vectores disponibles para este fin, y la selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño del ácido nucleico que se insertará en el vector y de la célula huésped 15 particular que se transformará con el vector. Cada vector contiene varios componentes dependiendo de su función (por ejemplo, amplificación de ADN o expresión de ADN) y la célula huésped particular con la que es compatible.

Para impartir resistencia a las plagas de coleópteros a una planta transgénica, se puede transcribir, por ejemplo, un ADN recombinante para producir una molécula de ARNi (por ejemplo, una molécula de ARN que forma una molécula de ARNdc) dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante. Una molécula de ARNi puede comprender una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente homóloga y específicamente hibridable con una secuencia de nucleótidos transcrita correspondiente dentro de una plaga de coleópteros que puede causar daño a la especie de planta huésped. La plaga de coleópteros puede ponerse en contacto con la molécula de ARNi que se transcribe en células de la planta huésped transgénica, por ejemplo, al ingerir células o fluidos de la planta huésped transgénica que comprenden la molécula de ARNi. Por tanto, la expresión de un gen diana es suprimida por la molécula de ARNi dentro 20 de las plagas de coleópteros que infestan la planta huésped transgénica. La supresión de la expresión del gen diana en la plaga de coleópteros diana puede dar como resultado que la planta sea resistente al ataque de la plaga.

25 Para permitir el suministro de moléculas de ARNi a una plaga de coleópteros en una relación nutricional con una célula vegetal que ha sido transformada con una molécula de ácido nucleico recombinante, se requiere la expresión (es decir, transcripción) de moléculas de ARNi en la célula vegetal. Por tanto, una molécula de ácido nucleico recombinante 30 puede comprender una secuencia de nucleótidos operativamente ligada a una o más secuencias reguladoras, tal como una secuencia promotora heteróloga que funciona en una célula huésped, tal como una célula bacteriana en la que la molécula de ácido nucleico va a amplificarse, y una célula vegetal en la que se va a expresar la molécula de ácido nucleico.

35 Los promotores adecuados para uso en moléculas de ácido nucleico incluyen aquellos que son inducibles, virales, sintéticos o constitutivos, todos los cuales son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes que describen dichos promotores incluyen Patentes de EE. UU. Nos. 6,437,217 (promotor RS81 de maíz); 5,641,876 (promotor de 40 actina de arroz); 6,426,446 (promotor RS324 de maíz); 6,429,362 (promotor PR-1 de maíz); 6,232,526 (promotor A3 de maíz); 6,177,611 (promotores constitutivos del maíz); 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196 (promotor CaMV 35S); 6,433,252 (promotor de oleosina L3 de maíz); 6,429,357 (promotor de actina 2 de arroz e intrón de actina 2 de arroz); 6,294,714 (promotores inducibles por luz); 6,140,078 (promotores inducibles por sal); 6,252,138 (promotores inducibles por patógenos); 6,175,060 (promotores inducibles por deficiencia de fósforo); 6,388,170 (promotores bidireccionales); 6,635,806 (promotor gamma-coixina); y Publicación de Patente de EE. UU. No. 2009/757,089 (promotor de la cloroplasto aldolasa del maíz). Los promotores adicionales incluyen el promotor de la 45 nopalina sintasa (NOS) (Ebert et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745-5749) y los promotores de la octopina sintasa (OCS) (que se transportan en plásmidos inductores de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*); los promotores del caulimovirus, como el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Lawton et al. (1987) 50 Plant Mol. Biol. 9:315-324); el promotor CaMV 35S (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; el promotor 35S del virus del mosaico de la higuera (Walker et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19):6624-6628); el promotor de la sacarosa sintasa (Yang and Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-4148); el promotor del complejo del gen R (Chandler et al. (1989) Plant Cell 1:1175-1183); el promotor del gen de la proteína de unión a clorofila a/b; CamV 55 35S (Patentes de EE. UU. Nos. 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196); FMV 35S (Patentes de EE. UU. Nos. 5,378,619 y 6,051,753); un promotor PC1SV (Patente de EE. UU. No. 5,850,019); el promotor SCP1 (Patente de EE. UU. No. 6,677,503); y promotores de AGRtu.nos (GENBANK® Número de acceso V00087; Depicker et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:561-573; Bevan et al. (1983) Nature 304:184-187).

60 Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender un promotor específico de tejido, tal como un promotor específico de raíz. Los promotores específicos de la raíz impulsan la expresión de secuencias codificantes ligadas operativamente exclusiva o preferentemente en el tejido de la raíz. En la técnica se conocen ejemplos de promotores específicos de raíces. Véase, por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nos. 5,110,732; 5,459,252 y 5,837,848; y Opperman et al. (1994) Ciencia 263:221-3; y Hirel et al. (1992) Plant Mol. Biol. 20:207-18. Se puede clonar una secuencia o fragmento de nucleótidos para el control de plagas de coleópteros entre dos promotores específicos de raíz orientados 65 en direcciones transcripcionales opuestas con respecto a la secuencia o fragmento de nucleótidos, y que son operables en una célula vegetal transgénica y se expresan en la misma para producir moléculas de ARN en la célula

vegetal transgénica que posteriormente puede formar moléculas de ARNdc, como se describe, supra. Las moléculas de ARNi expresadas en tejidos vegetales pueden ser ingeridas por una plaga de coleópteros de tal manera que se logre la supresión de la expresión del gen diana.

- 5 Secuencias reguladoras adicionales que opcionalmente se pueden ligar operativamente a una molécula de ácido nucleico de interés incluyen 5'UTR que funcionan como una secuencia líder de traducción ubicada entre una secuencia promotora y una secuencia codificante. La secuencia líder de traducción está presente en el ARNm completamente procesado y puede afectar el procesamiento del transcripto primario y/o la estabilidad del ARN. Ejemplos de secuencias líderes de traducción incluyen líderes de proteínas de choque térmico de maíz y petunia (Patente de EE.UU. No. 5,362,865), líderes de proteínas de cubierta de virus vegetales, líderes de rubiscos vegetales y otros. Véase, por ejemplo, Turner and Foster (1995) Molecular Biotech. 3(3):225-36. Ejemplos no limitantes de 5'UTR incluyen GmHsp (Patente de EE. UU. No. 5,659,122); PhDnaK (Patente de EE.UU. No. 5,362,865); AtAnt1; TEV (Carrington and Freed (1990) J. Virol. 64:1590-7); y AGRtunos (GENBANK® Número de acceso V00087; y Bevan et al. (1983) Nature 304:184-7).
- 10 15 Secuencias reguladoras adicionales que opcionalmente se pueden ligar operativamente a una molécula de ácido nucleico de interés también incluyen secuencias 3' no traducidas, regiones de terminación de la transcripción 3' o regiones de poliadenilación. Estos son elementos genéticos ubicados en dirección descendente de una secuencia de nucleótidos e incluyen polinucleótidos que proporcionan una 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 para provocar la adición de nucleótidos de poliadenilato al extremo 3' del precursor del ARNm. La secuencia de poliadenilación se puede derivar de una variedad de genes vegetales o de 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. USA 80:4803-7). Un ejemplo del uso de diferentes regiones 3' no traducidas se proporciona en Ingelbrecht et al., (1989) Plant Cell 1:671-80. Los ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación incluyen una de un gen RbcS2 de *Pisum sativum* (Ps.RbcS2-E9; Coruzzi et al. (1984) EMBO J. 3:1671-9) y AGRtu.nos (GENBANK® Número de acceso E01312).
- 20 25 30 35 40 Algunas realizaciones incluyen un vector de transformación de plantas que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención. Cuando se expresan, una o más secuencias de nucleótidos dan como resultado una o más molécula(s) de ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos que es específicamente complementaria a toda o parte de una molécula de ARN nativa en una plaga de coleópteros. Por lo tanto, la(s) secuencia(s) de nucleótidos pueden comprender un segmento que codifica todo o parte de una secuencia de ribonucleótidos presente dentro de un transcripto de ARN de plaga de coleópteros diana, y pueden comprender repeticiones invertidas de todo o una parte de un transcripto de plaga de coleópteros diana. Un vector de transformación de plantas puede contener secuencias específicamente complementarias a más de una secuencia diana, permitiendo esta manera la producción de más de un ARNi para inhibir la expresión de dos o más genes en células de una o más poblaciones o especies de plagas de coleópteros diana. Los segmentos de secuencia de nucleótidos específicamente complementarios a secuencias de nucleótidos presentes en diferentes genes se pueden combinar en una única molécula compuesta de ácido nucleico para expresión en una planta transgénica. Dichos segmentos pueden ser contiguos o estar separados por una secuencia separadora.
- 45 50 55 60 65 Un plásmido que ya contiene al menos una(s) secuencia(s) de nucleótidos se puede modificar mediante la inserción secuencial de secuencia(s) de nucleótidos adicionales en el mismo plásmido, en el que las secuencias de nucleótidos adicionales están operativamente ligadas a los mismos elementos reguladores que el original, al menos una secuencia(s) de nucleótidos. Se puede diseñar una molécula de ácido nucleico para la inhibición de múltiples genes diana. Los múltiples genes que se van a inhibir se pueden obtener de la misma especie de plaga de coleópteros, lo que puede potenciar la eficacia de la molécula de ácido nucleico. Alternativamente, los genes se pueden derivar de diferentes plagas de coleópteros, lo que puede ampliar la gama de plagas de coleópteros contra las cuales el(es) agente(s) es/son eficaces. Cuando se seleccionan múltiples genes para su supresión o una combinación de expresión y supresión, se puede fabricar un elemento de ADN policistrónico.
- Una molécula o vector de ácido nucleico recombinante puede comprender un marcador seleccionable que confiere un fenotipo seleccionable a una célula transformada, tal como una célula vegetal. También se pueden utilizar marcadores seleccionables para seleccionar plantas o células vegetales que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante. El marcador puede codificar resistencia a biocidas, resistencia a antibióticos (por ejemplo, kanamicina, geneticina (G418), bleomicina, higromicina, etc.), o resistencia a herbicidas (por ejemplo, glifosato, etc.). Ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a: un gen neo que codifica la resistencia a la kanamicina y se puede seleccionar para utilizar kanamicina, G418, etc.; un gen bar que codifica la resistencia al bialafos; un gen mutante de la EPSP sintasa que codifica la resistencia al glifosato; un gen de nitrilasa que confiere resistencia al bromoxinilo; un gen de acetolactato sintasa mutante (ALS) que confiere resistencia a imidazolinona o sulfonilurea; y un gen DHFR resistente al metotrexato. Están disponibles múltiples marcadores seleccionables que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfomicina, puromicina, espectinomicina, rifampicina, estreptomicina y tetraciclina, y similares. Ejemplos de dichos marcadores seleccionables se ilustran en, por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nos. 5,550,318; 5,633,435; 5,780,708 y 6,118,047.

Una molécula o vector de ácido nucleico recombinante también puede incluir un marcador cribable. Se pueden utilizar marcadores cribables para monitorizar la expresión. Los marcadores cribables de ejemplo incluyen una  $\beta$ -glucuronidasa o gen uidA (GUS) que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos (Jefferson et al. (1987) *Plant Mol. Biol. Reps.* 5:387-405); un gen del locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos antocianinas (color rojo) en los tejidos vegetales (Dellaporta et al. (1988) "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon tagging with Ac." In 18th Stadler Genetics Symposium, P. Gustafson and R. Appels, eds. (New York: Plenum), pp. 263-82); un gen de  $\beta$ -lactamasa (Sutcliffe et al. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-41); un gen que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen de luciferasa (Ow et al. (1986) *Science* 234:856-9); un gen xilE que codifica una catecol dioxygenasa que puede convertir cateoles cromogénicos (Zukowski et al. (1983) *Gene* 46(2-3):247-55); un gen de amilasa (Ikatu et al. (1990) *Bio/Technol.* 8:241-2); un gen de tirosinasa que codifica una enzima capaz de oxidar la tirosina a DOPA y dopaquinona que a su vez se condensa en melanina (Katz et al. (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-14);) y una  $\alpha$ -galactosidasa.

Las moléculas de ácido nucleico recombinantes, como se describe, supra, se pueden utilizar en métodos para la creación de plantas transgénicas y la expresión de ácidos nucleicos heterólogos en plantas para preparar plantas transgénicas que exhiban susceptibilidad reducida a plagas de coleópteros. Los vectores de transformación de plantas se pueden preparar, por ejemplo, al insertar moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de ARNi en vectores de transformación de plantas e introduciéndolas en plantas.

Los métodos adecuados para la transformación de células huésped incluyen cualquier método mediante el cual se pueda introducir ADN en una célula, tal como mediante transformación de protoplastos (Véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. No. 5,508,184), por absorción de ADN mediada por desecación/inhibición (Véase, por ejemplo, Potrykus et al. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:183-8), por electroporación (Véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. No. 5,384,253), por agitación con fibras de carburo de silicio (Véase, por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nos. 5,302,523 y 5,464,765), por transformación mediada por Agrobacterium (Véase, por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nos. 5,563,055; 5,591,616; 5,693,512; 5,824,877; 5,981,840; y 6,384,301) y por aceleración de partículas recubiertas de ADN (Véase, por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nos. 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 transformar maíz se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. Nos. 5,591,616, 7,060,876 y 7,939,328. Mediante la aplicación de técnicas como estas, las células de prácticamente cualquier especie pueden transformarse de manera estable. El ADN transformante se puede integrar en el genoma de la célula huésped. En el caso de especies multicelulares, las células transgénicas se pueden regenerar en un organismo transgénico. Cualquiera de estas técnicas se puede utilizar para producir una planta transgénica, por ejemplo, que comprende una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican una o más moléculas de ARNi en el genoma de la planta transgénica.

El método más utilizado para introducir un vector de expresión en plantas se basa en el sistema de transformación natural de varias especies de Agrobacterium. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias del suelo patógenas para las plantas que transforman genéticamente las células vegetales. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación génica de la planta. Los plásmidos Ti (inductores de tumores) contienen un gran segmento, 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 del ADN-T está bordeada por repeticiones terminales. En los vectores binarios modificados, los genes inductores de tumores se han suprimido y las funciones de la región Vir se utilizan para transferir ADN extraño bordeado por las secuencias fronterizas del ADN-T. La región T también puede contener un marcador seleccionable para la recuperación eficaz de células y plantas transgénicas, y un sitio de clonación múltiple para insertar secuencias para transferencia tales como un ARNdc que codifica un ácido nucleico.

Por lo tanto, un vector de transformación de plantas se puede derivar de un plásmido Ti de *A. tumefaciens* (Véase, por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nos. 4,536,475, 4,693,977, 4,886,937, y 5,501,967; y Patente Europea No. EP 0 122 791) o un plásmido Ri de *A. rhizogenes*. Los vectores de transformación de plantas adicionales incluyen, por ejemplo y sin limitación, aquellos descritos por Herrera-Estrella et al. (1983) *Nature* 303:209-13; Bevan et al. (1983) *Nature* 304: 184-7; Klee et al. (1985) *Bio/Technol.* 3:637-42; y en la Patente Europea No. EP 0 120 516, y los derivados de cualquiera de los anteriores. Otras bacterias tales como *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, y *Mesorhizobium* que interactúan con las plantas de forma natural se pueden modificar para mediar la transferencia de genes a diversas plantas. Estas bacterias simbóticas asociadas a plantas pueden volverse competentes para la transferencia de genes mediante la adquisición de un plásmido Ti desarmado y un vector binario adecuado.

Después de proporcionar ADN exógeno a las células receptoras, las células transformadas generalmente se identifican para su posterior cultivo y regeneración de plantas. Para mejorar la capacidad de identificar células transformadas, es posible que desee emplear un gen marcador seleccionable o cribable, como se estableció anteriormente, con el vector de transformación utilizado para generar el transformante. En el caso en que se utilice un marcador seleccionable, las células transformadas se identifican dentro de la población celular potencialmente transformada al exponer las células a un agente o agentes selectivos. En el caso en que se use un marcador cribable, las células pueden rastrearse para determinar el rasgo del gen marcador deseado.

- Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o las células que han obtenido resultados positivos en un ensayo de cribado, se pueden cultivar en medios que favorezcan la regeneración de las plantas. Cualquier medio de cultivo de tejidos vegetales adecuado (por ejemplo, Los medios MS y N6) se pueden modificar al incluir sustancias adicionales, tales como reguladores del crecimiento. El tejido se puede mantener en un medio básico con reguladores de crecimiento hasta que haya suficiente tejido disponible para comenzar los esfuerzos de regeneración de la planta, o después de rondas repetidas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración (por ejemplo, normalmente aproximadamente 2 semanas), luego se transfiere a un medio propicio para la formación de brotes. Los cultivos se transfieren periódicamente hasta que se haya formado suficiente brote. Una vez que se forman los brotes, se transfieren a medios propicios para la formación de raíces. Una vez que se forman suficientes raíces, las plantas se pueden transferir al suelo para un mayor crecimiento y maduración.
- Para confirmar la presencia de una molécula de ácido nucleico de interés (por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica una o más moléculas de ARNi que inhiben la expresión del gen diana en una plaga de coleópteros) en las plantas en regeneración, se pueden realizar diversos ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo: ensayos de biología molecular, tales como transferencia Southern y Northern, PCR y secuenciación de ácidos nucleicos; ensayos bioquímicos, tal como la detección de la presencia de un producto de proteína, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y/o inmunotransferencias) o por 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 se pueden analizar, por ejemplo, mediante amplificación por PCR utilizando, por ejemplo, cebadores oligonucleotídicos específicos para una molécula de ácido nucleico de interés. Se entiende que el genotipado por PCR incluye, pero no se limita a, la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADN genómico derivado de tejido de callo de planta huésped aislado que se predice que contiene una molécula de ácido nucleico de interés integrada en el genoma, seguida de clonación estándar y Análisis de secuencia de productos de amplificación por PCR. Los métodos de genotipado por PCR se han descrito bien (por ejemplo, Rios, G. et al. (2002) *Plant J.* 32:243-53) y se puede aplicar al ADN genómico derivado de cualquier especie vegetal (por ejemplo, *Z. mays* o *G. max*) o tipo de tejido, incluidos cultivos celulares.
- Una planta transgénica formada utilizando los métodos de transformación dependientes de *Agrobacterium* suelen contener una única secuencia de ADN recombinante insertada en un cromosoma. La única secuencia de ADN recombinante se denomina "evento transgénico" o "evento de integración". Dichas plantas transgénicas son hemicigotas para la secuencia exógena insertada. Una planta transgénica homocigota con respecto a un transgén se puede obtener al aparear sexualmente (autofecundación) una planta transgénica segregante independiente que contiene una única secuencia de genes exógena a sí misma, por ejemplo una  $T_0$  planta, para producir semilla  $T_1$ . Un cuarto de la semilla  $T_1$  producida será homocigótica con respecto al transgén. La semilla de germinado  $T_1$  da como resultado plantas en las que se puede analizar la heterocigosidad, normalmente utilizando un ensayo de SNP o un ensayo de amplificación térmica que permite la distinción entre heterocigotos y homocigotos (es decir, un ensayo de cigosidad).
- En una célula vegetal se pueden producir al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más moléculas de ARNi diferentes que tienen un efecto inhibidor de plagas de coleópteros. Las moléculas de ARNi (por ejemplo, moléculas de ARNdc) se pueden expresar a partir de múltiples secuencias de ácidos nucleicos introducidas en diferentes eventos de transformación, o a partir de una única secuencia de ácidos nucleicos introducida en un único evento de transformación. En algunos casos, se expresa una pluralidad de moléculas de ARNi bajo el control de un único promotor. En otros casos, se expresa una pluralidad de ARNi bajo el control de múltiples promotores. Se pueden expresar moléculas de ARNi únicas que comprenden múltiples secuencias de ácidos nucleicos, cada una de las cuales es homóloga a diferentes loci dentro de una o más plagas de coleópteros (por ejemplo, el locus definido por las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77 y 81), tanto en diferentes poblaciones de la misma especie de plaga de coleópteros, como en diferentes especies de plaga de coleópteros.
- Además de la transformación directa de una planta con una molécula de ácido nucleico recombinante, se pueden preparar plantas transgénicas al cruzar 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 una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARNi se puede introducir en una primera línea de planta que es susceptible de transformación para producir una planta transgénica, cuya planta transgénica se puede cruzar con una segunda línea de planta para introgresar en la Secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de ARNi en la segunda línea de plantas.
- También se incluyen productos básicos que contienen una o más de las secuencias descritas en el presente documento. Los ejemplos particulares incluyen productos básicos producidos a partir de una planta o semilla recombinante que contiene una o más de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento. Se pretende que un producto básico que contiene una o más de las secuencias descritas en el presente documento incluya, pero no se limite a, harinas, aceites, granos o semillas triturados o integrales de una planta, o cualquier alimento o alimento para animales que comprenda cualquier harina, aceite, o grano triturado o entero de una planta o semilla recombinante que contiene una o más de las secuencias divulgadas en el presente documento. La detección

de una o más de las secuencias divulgadas en el presente documento en uno o más productos básicos o productos de consumo contemplados en el presente documento es de facto evidencia de que el producto básico o producto de consumo se produce a partir de una planta transgénica diseñada para expresar una o más de las secuencias de nucleótidos divulgados en el presente documento con el fin de controlar plagas de plantas de coleópteros utilizando 5 métodos de supresión de genes mediados por ARNi.

En algunos aspectos, se incluyen semillas y productos básicos producidos por plantas transgénicas derivadas de células vegetales transformadas, en los que las semillas o productos básicos comprenden una cantidad detectable de una secuencia de ácidos nucleicos divulgada en el presente documento. Estos productos básicos se pueden producir, 10 por ejemplo, al obtener plantas transgénicas y preparar alimentos o piensos a partir de ellas. Los productos básicos que comprenden una o más de las secuencias de ácidos nucleicos divulgadas en el presente documento incluyen, por ejemplo y sin limitación: harinas, aceites, cereales triturados o integrales o semillas de una planta, y cualquier producto alimenticio que comprenda cualquier harina, aceite o grano triturado o integral de una planta o semilla recombinante que comprende una o más de las secuencias de ácidos nucleicos divulgadas en el presente documento. La detección 15 de una o más de las secuencias divulgadas en el presente documento en uno o más productos básicos o productos de consumo es de facto evidencia de que el producto básico o producto de consumo se produce a partir de una planta transgénica diseñada para expresar una o más de las moléculas de ARNi divulgadas en el presente documento con el fin de controlar plagas de coleópteros.

20 Una planta o semilla transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento 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 distintos de los definido por las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77 y 81, tal como, por ejemplo, uno o más loci seleccionados del grupo que consiste en Caf1-180 (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2012/0174258), VatpasaC (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2012/0174259), Rho1 (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2012/0174260), VatpasaH (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2012/0198586), PPI-87B (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2013/0091600), RPA70 (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2013/0091601), y RPS6 (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2013/0097730); un evento transgénico a partir del cual se transcribe una molécula de ARNi dirigida a un gen en un organismo distinto de una plaga de coleópteros (por ejemplo, un nematodo parásito de las plantas); un gen que codifica 25 una proteína insecticida (por ejemplo, una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*, tal como, por ejemplo, Cry34Ab1 (Patente de EE.UU. Nos 6,127,180, 6,340,593, y 6,624,145), Cry35Ab1 (Patente de EE.UU. Nos 6,083,499, 6,340,593, y 6,548,291), una combinación "Cry34/35Ab1" en un solo evento (por ejemplo, evento de maíz DAS-59122-7; Patente de EE.UU. No. 7,323,556), Cry3A (por ejemplo, Patente de EE.UU. No. 7,230,167), Cry3B (por ejemplo, 30 Patente de EE. UU. No. 8,101,826), Cry6A (por ejemplo, Patente de EE.UU. No. 6,831,062), y combinaciones de los mismos (por ejemplo, Solicitudes de Patente de EE. UU. Nos. 2013/0167268, 2013/0167269, y 2013/0180016); un gen de tolerancia a herbicidas (por ejemplo, un gen que proporciona tolerancia al glifosato, glufosinato, dicamba o 2,4-D (por ejemplo, Patente de EE.UU. No. 7,838,733)); y un gen que contribuye a un fenotipo deseable en la planta transgénica, tal como mayor rendimiento, alteración del metabolismo de los ácidos grasos o restauración de la 35 esterilidad masculina citoplasmática). Las secuencias que codifican moléculas de ARNi divulgadas en el presente documento se pueden combinar con otros controles de insectos o con rasgos de resistencia a enfermedades en una planta para lograr los rasgos deseados para un mejor control del daño por insectos y enfermedades de las plantas. La combinación de rasgos de control de insectos que emplean distintos modos de acción puede proporcionar plantas transgénicas protegidas con una durabilidad superior a las plantas que albergan un único rasgo de control, por ejemplo, 40 debido a la menor probabilidad de que se desarrolle resistencia a el(s) rasgo(s) en el campo.

#### V. Supresión de genes diana en una plaga de coleópteros

##### A. Descripción general

50 Se puede proporcionar a una plaga de coleópteros al menos una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de coleópteros, en el que la molécula de ácido nucleico conduce al silenciamiento génico mediado por ARNi en la plaga de coleópteros. Se pueden proporcionar una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn) a la plaga de coleópteros. Se puede proporcionar una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas 55 de coleópteros a una plaga de coleópteros al poner en contacto la molécula de ácido nucleico con la plaga de coleópteros. En estas y realizaciones adicionales, se puede proporcionar una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de coleópteros en un sustrato alimentario de la plaga de coleópteros, por ejemplo, una composición nutricional. En estos y ejemplos adicionales, se puede proporcionar una molécula de ácido nucleico útil para el control 60 de plagas de coleópteros mediante la ingestión de material vegetal que comprende la molécula de ácido nucleico que es ingerida por la plaga de coleópteros. En ciertos ejemplos, la molécula de ácido nucleico está presente en material vegetal mediante la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos recombinante introducida en el material vegetal, por ejemplo, mediante transformación de una célula vegetal con un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos recombinante y regeneración de un material de planta o planta completa a partir de la célula vegetal transformada.

##### B. Supresión del gen diana mediada por ARNi

- En el presente documento se divultan moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdc, ARNip, ARNmi y ARNhn) que se pueden diseñar para dirigir a secuencias de nucleótidos nativas esenciales (por ejemplo, genes esenciales) en el transcriptoma de una plaga de coleópteros (por ejemplo, WCR o NCR o PB), por ejemplo al diseñar una molécula de ARNi que comprende al menos una cadena que comprende una secuencia de nucleótidos que es específicamente complementaria a la secuencia diana. La secuencia de una molécula de ARNi así diseñada puede ser idéntica o completamente complementaria a la secuencia diana, o puede incorporar emparejamientos erróneos que no impiden la hibridación específica entre la molécula de ARNi y su secuencia diana.
- 5 Las moléculas de ARNi como se divultan en el presente documento se pueden utilizar en métodos para la supresión génica en una plaga de coleópteros, reduciendo esta manera el nivel o la incidencia del daño causado por la plaga en una planta (por ejemplo, una planta transformada protegida que comprende una molécula de ARNi). Como se utiliza en el presente documento, el término "supresión génica" se refiere a cualquiera de los métodos bien conocidos para reducir los niveles de proteína producida como resultado de la transcripción génica a ARNm y la posterior traducción del ARNm, que incluye la reducción de la expresión de proteínas a partir de un gen o una secuencia codificante que incluye inhibición postranscripcional de la expresión y supresión transcripcional. La inhibición postranscripcional está mediada por una homología específica entre todo o una parte de un ARNm transcripto a partir de un gen dirigido a la supresión y la correspondiente molécula de ARNi utilizada para la supresión. Adicionalmente, la inhibición postranscripcional se refiere a la reducción sustancial y mensurable de la cantidad de ARNm disponible en la célula para la unión a los ribosomas.
- 10 En los casos en los que una molécula de ARNi es una molécula de ARNdc, la enzima DICER puede escindir la molécula de ARNdc en moléculas cortas de ARNip (aproximadamente 20 nucleótidos de longitud). La molécula de ARNip de doble cadena generada por la actividad DICER sobre la molécula de ARNdc se puede separar en dos ARNip de cadena sencilla; el "cadena pasajera" y la "cadena guía". La cadena pasajera se puede degradar y la cadena guía se puede incorporar a RISC. La inhibición postranscripcional se produce mediante la hibridación específica de la cadena guía con una secuencia específicamente complementaria de una molécula de ARNm y la posterior escisión por la enzima Argonauta (componente catalítico del complejo RISC).
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- En los casos en los que una molécula de ARNi es una molécula de ARNdc, la enzima DICER puede escindir la molécula de ARNdc en moléculas cortas de ARNip (aproximadamente 20 nucleótidos de longitud). La molécula de ARNip de doble cadena generada por la actividad DICER sobre la molécula de ARNdc se puede separar en dos ARNip de cadena sencilla; el "cadena pasajera" y la "cadena guía". La cadena pasajera se puede degradar y la cadena guía se puede incorporar a RISC. La inhibición postranscripcional se produce mediante la hibridación específica de la cadena guía con una secuencia específicamente complementaria de una molécula de ARNm y la posterior escisión por la enzima Argonauta (componente catalítico del complejo RISC).
- La expresión de la molécula de ácido nucleico que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos se utiliza para la inhibición postranscripcional de un gen diana en una plaga de coleópteros, en la que la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y 5, o el complemento de la SEQ ID NO: 4 o 5, que es una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR).
- La expresión de la molécula de ácido nucleico que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos se utiliza para la inhibición postranscripcional de un gen diana en una plaga de coleópteros, en la que la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y 5, o el complemento de la SEQ ID NO: 4 o 5, que es una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR).
- Es una característica importante que el sistema de inhibición postranscripcional de ARNi sea capaz de tolerar variaciones de secuencia entre los genes diana que podrían esperarse debido a una mutación génica, un polimorfismo de ceja o una divergencia evolutiva. Es posible que no sea necesario que la molécula de ácido nucleico introducida sea absolutamente homóloga ni a un producto de transcripción primario ni a un ARNm completamente procesado de un gen diana, siempre que la molécula de ácido nucleico introducida sea específicamente hibridable con un producto de transcripción primario o un ARNm completamente procesado del gen diana. Más aún, es posible que no sea necesario que la molécula de ácido nucleico introducida sea de longitud completa, en relación con un producto de transcripción primario o con un ARNm completamente procesado del gen diana.
- La inhibición de un gen diana utilizando la tecnología de ARNi divulgada en el presente documento es específica de secuencia; es decir, secuencias de nucleótidos sustancialmente homólogas a la(s) molécula(s) de ARNi son la diana de la inhibición génica. Para la inhibición se puede utilizar una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos idéntica o complementaria a una porción de una secuencia de gen diana. En estos y otros ejemplos, se puede utilizar una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos con una o más inserciones, supresiones y/o mutaciones puntuales con respecto a una secuencia de gen diana. Por ejemplo, una molécula de ARNi y una porción de un gen diana pueden compartir, por ejemplo, al menos desde aproximadamente 80 %, al menos desde aproximadamente 81 %, al menos desde aproximadamente 82 %, al menos desde aproximadamente 83 %, al menos desde aproximadamente 84 %, al menos desde aproximadamente 85 %, al menos desde aproximadamente 86 %, al menos desde aproximadamente 87 %, al menos desde aproximadamente 88 %, al menos desde aproximadamente 89 %, al menos desde aproximadamente 90 %, al menos desde aproximadamente 91 %, al menos

desde aproximadamente 92 %, al menos desde aproximadamente 93 %, al menos desde aproximadamente 94 %, al menos desde 30 aproximadamente 95 %, al menos desde aproximadamente 96 %, al menos desde aproximadamente 97 %, al menos desde aproximadamente 98 %, al menos desde aproximadamente 99 %, al menos desde aproximadamente 100 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y 100 % de identidad de secuencia. Alternativamente, la región dúplex de una molécula de ARNdc se puede hibridar específicamente con una porción de un transcripto de gen diana. En moléculas específicamente hibridables, una secuencia de longitud inferior a la completa que muestra una mayor homología compensa una secuencia más larga y menos homóloga. La longitud de la secuencia de nucleótidos de una región dúplex de una molécula de ARNdc que es idéntica o complementaria a una porción de un transcripto de gen diana

5 puede ser al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, o al menos aproximadamente 1000, o 25, 26, 10 27, 28, 29, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o 1000 bases. En ejemplos particulares, se puede utilizar una secuencia de más de aproximadamente 100 a 200 nucleótidos, de 200 a 300 nucleótidos o de 300 a 500 nucleótidos, o una secuencia de más de aproximadamente 500 a 1000 nucleótidos, dependiendo del tamaño del gen diana.

15 La expresión de un gen diana en una plaga de coleópteros se puede inhibir en al menos un 10 %; al menos el 33 %; al menos el 50 %; o al menos el 80 % dentro de una célula de la plaga de coleópteros, de tal manera que tenga lugar una inhibición significativa. La inhibición significativa se refiere a la inhibición por encima de un umbral que da como resultado un fenotipo detectable (por ejemplo, cese del crecimiento, cese de la alimentación, cese del desarrollo, mortalidad inducida, etc.), o una disminución detectable en el ARN y/o el producto génico correspondiente al gen diana 20 que se está inhibiendo. Aunque en ciertos ejemplos la inhibición se produce sustancialmente en todas las células de la plaga de coleópteros, en otros casos la inhibición se produce sólo en un subconjunto de células que expresan el gen diana.

25 La supresión transcripcional en una célula puede estar mediada por la presencia de una molécula de ARNi que exhibe una identidad de secuencia sustancial con una secuencia de ADN promotora o complemento de la misma, para efectuar lo que se denomina "supresión trans del promotor". La supresión génica puede ser eficaz contra genes diana en una plaga de coleópteros que pueden ingerir o ponerse en contacto con dichas moléculas de ARNi, por ejemplo, al 30 ingerir o poner en contacto material vegetal que contiene las moléculas de ARNdc. Las moléculas de ARNi para uso en la supresión trans del promotor se pueden diseñar específicamente para inhibir o suprimir la expresión de una o más secuencias homólogas o complementarias en las células de la plaga de coleópteros. La supresión génica postranscripcional mediante ARN antisentido u orientado al sentido para regular la expresión génica en células vegetales se divulga en las Patentes de EE. UU. Nos. 5,107,065, 5,231,020, 5,283,184, y 5,759,829.

#### C. Expresión de moléculas de ARNi proporcionadas a una plaga de coleópteros

35 La expresión de moléculas de ARNi para la inhibición de genes mediada por ARNi en una plaga de coleópteros se puede llevar a cabo en cualquiera de muchos formatos *in vitro* o *in vivo*. Las moléculas de ARNi luego se pueden proporcionar a una plaga de coleópteros, por ejemplo, al poner en contacto las moléculas de ARNi con la plaga, o hacer que la plaga ingiera o internalice de otro modo las moléculas de ARNi. Algunos ejemplos incluyen plantas 40 huésped transformadas de una plaga de coleópteros, células vegetales transformadas y progenie de plantas transformadas. Las células vegetales transformadas y las plantas transformadas se pueden diseñar para expresar una o más de las moléculas de ARNi, por ejemplo, bajo el control de un promotor heterólogo, para proporcionar un efecto protector de plagas. Por lo tanto, cuando una plaga de coleópteros consume una planta o célula vegetal transgénica durante la alimentación, la plaga puede ingerir moléculas de ARNi expresadas en las plantas o células transgénicas. 45 Las secuencias de nucleótidos divulgadas en el presente documento también se pueden introducir en una amplia variedad de microorganismos huéspedes procarióticos y eucariotas para producir moléculas de ARNi. El término "microorganismo" incluye especies procarióticas y eucariotas, tales como bacterias y hongos.

50 La modulación de la expresión génica puede incluir la supresión parcial o completa de dicha expresión. Un método para la supresión de la expresión génica en una plaga de coleópteros puede comprender proporcionar en el tejido del huésped de la plaga una cantidad supresora de genes de al menos una molécula de ARNi formada después de la transcripción de una secuencia de nucleótidos como se describe en el presente documento, al menos un segmento de que es complementario a una secuencia de ARNm dentro de las células de la plaga de coleópteros. Una molécula de ARNi, que incluye su forma modificada tal como una molécula de ARNdc, ARNip, ARNmi o ARNhn, ingerida por 55 una plaga de coleópteros, puede ser al menos desde 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 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a o complementario a una molécula de ARN transcrita a partir de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 73, 75, 77, o 81. Por lo tanto, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas y sustancialmente purificadas que incluyen, pero no se limitan a, secuencias de nucleótidos no naturales y construcciones de ADN recombinante para proporcionar moléculas de ARNi, que suprimen o inhiben la expresión de una secuencia codificante endógena o una secuencia codificante diana en la plaga de coleópteros cuando se introduce en ella.

También se divulga un sistema de suministro para el suministro de moléculas de ARNi para la inhibición postranscripcional de uno o más gen(es) diana en una plaga de plantas de coleópteros y el control de una población de la plaga de plantas de coleópteros. El sistema de suministro puede comprender la ingestión de una célula vegetal

- 5 transgénica huésped o contenidos de la célula huésped que comprenden moléculas de ARN transcritas en la célula huésped. En estos y casos adicionales, se crea una célula vegetal transgénica o una planta transgénica que contiene una construcción de ADN recombinante que proporciona una molécula de ARNdc estabilizada. Se pueden producir células vegetales transgénicas y plantas transgénicas que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican una molécula de ARNi particular al emplear tecnologías de ADN recombinante (cuyas tecnologías básicas son bien 10 conocidas en la técnica) para construir un vector de transformación de plantas que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARNi (por ejemplo, una molécula de ARNdc estabilizada); transformar una célula vegetal o planta; y generar la célula vegetal transgénica o la planta transgénica que contiene la molécula de ARNi transcrita.
- 15 Para conferir resistencia a las plagas de coleópteros a una planta transgénica, se puede transcribir una molécula de ADN recombinante, por ejemplo, para producir una molécula de ARNi, tal como una molécula de ARNdc, una molécula de ARNip, una molécula de ARNmi o una molécula de ARNhn. Una molécula de ARN transcrita a partir de una molécula de ADN transgénica recombinante puede formar una molécula de ARNdc dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante o dentro de los tejidos o fluidos de un organismo que entró en contacto o ingiere la molécula de ARN. 20 Dicha molécula de ARNi puede estar comprendida en parte de una secuencia de nucleótidos que es idéntica o complementaria a una secuencia de nucleótidos correspondiente transcrita a partir de una secuencia de ADN dentro de una plaga de coleópteros de un tipo que puede infestar la planta huésped. La expresión de un gen diana dentro de la plaga de coleópteros es suprimida por la molécula de ARNi ingerida, y la supresión de la expresión del gen diana en la plaga de coleópteros da como resultado, por ejemplo, el cese de la alimentación por parte de la plaga de coleópteros, siendo el resultado final: por ejemplo, que la planta transgénica esté protegida de daños mayores por 25 parte de la plaga de coleópteros. Se ha demostrado que los efectos moduladores de las moléculas de ARNi son 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 de mantenimiento; factores de transcripción; genes relacionados con la muda; y otros genes que codifican polipéptidos implicados en el metabolismo celular o en 30 el crecimiento y desarrollo normales.

Para la transcripción de un transgén in vivo o una construcción de expresión, se puede utilizar una región reguladora (por ejemplo, promotor, potenciador, silenciador y señal de poliadenilación) para regular la producción de la cadena (o cadenas) de ARN. Por lo tanto, como se establece, supra, una secuencia de nucleótidos para uso en la producción de

- 35 moléculas de ARNi puede estar ligada operativamente a una o más secuencias promotoras funcionales en una célula huésped de una planta. El promotor puede ser un promotor endógeno, normalmente residente en el genoma huésped. La secuencia de nucleótidos, bajo el control de una secuencia promotora operativamente ligada, puede estar flanqueada además por secuencias adicionales que afectan ventajosamente su transcripción y/o la estabilidad de un transcripto resultante. Dichas secuencias se pueden ubicar en dirección ascendente del promotor ligado 40 operativamente, en dirección descendente del extremo 3' de la construcción de expresión, y pueden aparecer tanto en dirección ascendente del promotor como en dirección descendente del extremo 3' de la construcción de expresión.

También se divultan métodos para reducir el daño a una planta huésped (por ejemplo, una planta de maíz) causada por una plaga de coleópteros que se alimenta de la planta, en la que el método comprende proporcionar en la planta

- 45 huésped una célula vegetal transformada que expresa al menos una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento, en la que la(s) molécula(s) de ácido nucleico funcionan al ser tomadas por la plaga de coleópteros para inhibir la expresión de una secuencia diana dentro de la plaga de coleópteros, cuya inhibición de la expresión da como resultado mortalidad, crecimiento reducido y/o reproducción reducida de la plaga de coleópteros, reduciendo esta manera el daño a la planta huésped causado por la plaga de coleópteros. La(s) molécula(s) de ácido 50 nucleico pueden comprender moléculas de ARNi. En estos y casos adicionales, la(s) molécula(s) de ácido nucleico codifican moléculas de ARNi y cada una comprende más de una secuencia de nucleótidos que es específicamente hibridable con una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros. La(s) molécula(s) de ácido nucleico pueden consistir en una secuencia de nucleótidos que es específicamente hibridable con una molécula 55 de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros.

- También se divulga un método para aumentar el rendimiento de un cultivo de maíz, en el que el método comprende introducir en una planta de maíz al menos una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento; cultivar la planta de maíz para permitir la expresión de una molécula de ARNi que comprende la secuencia de ácidos nucleicos, en la que la expresión de una molécula de ARNi que comprende la secuencia de ácidos nucleicos inhibe el crecimiento 60 de plagas de coleópteros y/o el daño de plagas de coleópteros, reduciendo o eliminando esta manera una pérdida de rendimiento debido a infestación por plagas de coleópteros. La molécula de ARNi puede ser una molécula de ARNdc. En estos y casos adicionales, la(s) molécula(s) de ácido nucleico codifican moléculas de ARNi y cada una comprende más de una secuencia de nucleótidos que es específicamente hibridable con una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros. La(s) molécula(s) de ácido nucleico pueden consistir en una 65 secuencia de nucleótidos que es específicamente hibridable con una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros.

- 5 También se divulga un método para modular la expresión de un gen diana en una plaga de coleópteros, el método comprende: transformar una célula vegetal con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos una molécula de ácido nucleico, en la que la secuencia de nucleótidos está ligada operativamente a un promotor y una secuencia 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 células vegetales transformadas que hayan integrado la molécula de ácido nucleico en sus genomas; cribar las células vegetales transformadas para determinar la expresión de una molécula de ARNi codificada por la molécula de ácido nucleico integrada; seleccionar una célula vegetal transgénica que exprese la molécula de ARNi; y alimentar la célula vegetal transgénica seleccionada a la plaga de coleópteros. Las plantas también se pueden regenerar a partir de células vegetales transformadas que expresan una molécula de ARNi codificada por la molécula de ácido nucleico integrada. La molécula de ARNi puede ser una molécula de ARNdc. En estos y casos adicionales, la(s) molécula(s) de ácido nucleico comprenden moléculas de ARNdc, cada una de las cuales comprende más de una secuencia de nucleótidos que es específicamente hibridable con una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros. La(s) molécula(s) de ácido nucleico pueden consistir en una secuencia de nucleótidos que es específicamente hibridable con una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Las moléculas de ARNi se pueden incorporar dentro de las semillas de una especie de planta (por ejemplo, maíz), ya sea como producto de la expresión de un gen recombinante incorporado en un genoma de las células vegetales, o como incorporado en un recubrimiento o tratamiento de semillas que se aplica a la semilla antes de plantarla. Una célula vegetal que comprende un gen recombinante se considera un evento transgénico. También se divultan sistemas de suministro para el suministro de moléculas de ARNi a plagas de coleópteros. Por ejemplo, las moléculas de ARNi se pueden introducir directamente en las células de una plaga de coleópteros. Los métodos de introducción pueden incluir la mezcla directa de ARNi con tejido vegetal de un huésped para la plaga de coleópteros, así como la aplicación de composiciones que comprenden ARNi al tejido de la planta huésped. Por ejemplo, se pueden pulverizar moléculas de ARNi sobre la superficie de una planta. Alternativamente, un microorganismo puede expresar una molécula de ARNi y el microorganismo se puede aplicar sobre la superficie de la planta o introducir en una raíz o tallo mediante un medio físico tal como una inyección. Como se discutió, supra, También se puede modificar genéticamente una planta transgénica para que exprese al menos una molécula de ARNi en una cantidad suficiente para matar las plagas de coleópteros que se sabe que infestan la planta. Las moléculas de ARNi producidas mediante síntesis química o enzimática también se pueden formular de manera consistente con las prácticas agrícolas comunes y utilizar como productos en aerosol para controlar el daño a las plantas causado por una plaga de coleópteros. Las formulaciones pueden incluir adhesivos y humectantes apropiados necesarios para una cobertura foliar eficiente, así como protectores UV para proteger las moléculas de ARNi (por ejemplo, moléculas de ARNdc) del daño causado por los rayos UV. Dichos aditivos se utilizan habitualmente en la industria de los bioinsecticidas y son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Dichas aplicaciones se pueden combinar con otras aplicaciones de insecticidas en aerosol (de base biológica o de otro tipo) para potenciar la protección de las plantas contra las plagas de coleópteros.
- Todas las referencias discutidas en el presente documento, que incluyen publicaciones, patentes y solicitudes de patente, citadas en este documento, se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento se debe interpretar como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de una invención anterior.
- Los siguientes EJEMPLOS se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o aspectos particulares. Estos EJEMPLOS no se deben interpretar como que limitan la divulgación a las características o aspectos particulares descritos.
- Ejemplos
- Ejemplo 1
- Identificación de genes diana candidatos
- Se seleccionaron múltiples estadios de WCR (Diabrotica virgifera virgifera LeConte) para el análisis del transcriptoma combinado para proporcionar secuencias de genes diana candidatos para el control mediante tecnología de resistencia a insectos de plantas transgénicas de ARNi.
- En un ejemplo, se aisló ARN total de aproximadamente 0.9 g de larvas WCR completas de primer estadio; (4 a 5 días después de la eclosión; mantenido a 16 °C) y purificó utilizando el siguiente método basado en fenol/TRI REAGENT® (MOLECULAR RESEARCH CENTER, Cincinnati, OH):
- Las larvas se homogeneizaron a temperatura ambiente en un homogeneizador de 15 ml con 10 ml de TRI REAGENT® hasta obtener una suspensión homogénea. Después de 5 min. Después de la incubación a temperatura ambiente, el homogeneizado se dispuso en tubos de microcentrifuga 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 dejar reposar la extracción a temperatura

ambiente durante 10 mins, 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 estéril de 1.5 ml y se agregó un volumen igual de isopropanol a temperatura ambiente. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos, la mezcla se centrifugó durante 8 minutos a 12,000 x g (4 °C o 25 °C).

5 El sobrenadante se eliminó y descartó cuidadosamente, y el sedimento de ARN se lavó dos veces mediante agitación vortical 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. Se eliminó cuidadosamente el etanol, se dejó secar el sedimento al aire durante 3 a 5 minutos y luego se disolvió en agua estéril libre de nucleasas. La concentración de ARN se determinó al medir la absorbancia (A) a 10 260 nm y 280 nm. Una extracción típica de aproximadamente 0.9 g de larvas produjo más de 1 mg de ARN total, con una relación A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> de 1.9. Por lo tanto, el ARN extraído se almacenó a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

15 La calidad del ARN se determinó al pasar una alícuota por un gel de agarosa al 1%. La solución de gel de agarosa se preparó utilizando tampón TAE 10x esterilizado en autoclave (Tris-acetato EDTA; la concentración 1x es Tris-acetato 0.04 M, EDTA 1 mM (sal de sodio del ácido etilendiaminotetraacético), pH 8.0) diluido con agua tratada con DEPC (pirocarbonato de dietilo) en un recipiente esterilizado en autoclave. Se utilizó 1x TAE como báfer de ejecución. Antes de uso, el tanque de electroforesis y el peine bien formado se limpiaron con RNASE AWAY® (INVITROGEN INC., Carlsbad, CA). Se mezclaron dos  $\mu$ l de muestra de ARN con 8  $\mu$ l de tampón TE (Tris HCl 10 mM, pH 7.0; EDTA 1 mM) y 10  $\mu$ l de tampón de muestra de ARN (catálogo de NOVAGEN® no. 70606; EMD4 Bioscience, Gibbstown, NJ). La muestra se calentó a 70 °C durante 3 min, se enfrió a temperatura ambiente y se cargaron 5  $\mu$ l (que contenían de 1 20  $\mu$ g a 2  $\mu$ g de ARN) por pocillo. Los marcadores de peso molecular de ARN disponibles comercialmente se ejecutaron simultáneamente en pocillos separados para comparar el tamaño molecular. El gel se hizo funcionar a 60 voltios durante 2 horas.

25 30 Un proveedor de servicios comerciales (EUROFINS MWG Operon, Huntsville, AL) preparó una biblioteca de ADNc normalizada a partir del ARN total de larvas, utilizando cebado aleatorio. La biblioteca de ADNc de larvas normalizada se secuenció a escala de 1/2 placa mediante la química de serie GS FLX 454 Titanium™ en EUROFINS MWG Operon, que resultó en más de 600,000 lecturas con una longitud de lectura promedio de 348 pb. Se ensamblaron 350,000 lecturas en más de 50,000 cíntigos. Tanto las lecturas sin ensamblar como los cíntigos se convirtieron en bases de datos BLASTable utilizando el programa disponible públicamente, FORMATDB (disponible en NCBI).

35 Las bibliotecas de ARN total y ADNc normalizado se prepararon de manera similar a partir de materiales recolectados en otros estadios de desarrollo de WCR. Se construyó una biblioteca de transcriptomas agrupada para el cribado de genes diana al combinar los miembros de la biblioteca de ADNc que representan los diversos estadios de desarrollo.

40 45 Los genes candidatos para el ARNi se seleccionaron utilizando información sobre los efectos letales del ARNi de genes particulares en otros insectos tales como *Drosophila* y *Tribolium*. Se planteó la hipótesis de que estos genes eran esenciales para la supervivencia y el crecimiento de los insectos coleópteros. Los homólogos del gen diana seleccionados se identificaron en la base de datos de secuencias del transcriptoma como se describe a continuación. Se amplificaron secuencias parciales o completas de los genes diana mediante PCR para preparar plantillas para la producción de ARN de doble cadena (ARNdc).

50 55 Las búsquedas de TBLASTN utilizando secuencias codificantes de proteínas candidatas se realizaron en bases de datos BLASTable que contenían las lecturas de secuencias de *Diabrotica* no ensambladas o los cíntigos ensamblados. Los golpes significativos a una secuencia de *Diabrotica* (definida como mejor que  $e^{-20}$  para homologías cíntigos y mejor que  $e^{-10}$  para homologías de lecturas de secuencias no ensambladas) se confirmaron utilizando BLASTX contra la base de datos no redundante NCBI. Los resultados de esta búsqueda BLASTX confirmaron que las secuencias de genes candidatos a homólogos de *Diabrotica* identificadas en la búsqueda de TBLASTN de hecho comprendían genes de *Diabrotica*, o fueron el mejor golpe para la secuencia del gen candidato de no *Diabrotica* presente en las secuencias de *Diabrotica*. En la mayoría de los casos, los genes candidatos de *Tribolium* que fueron anotados como codificantes de una proteína dieron una homología de secuencia inequívoca con una secuencia o secuencias en las secuencias de *Diabrotica* del transcriptoma. En algunos casos, quedó claro que algunos de los cíntigos de *Diabrotica* o lecturas de secuencias no ensambladas seleccionadas por homología con un gen candidato de no *Diabrotica* se superponían, y que el ensamble de los cíntigos no había logrado unir estas superposiciones. En esos casos, se utilizó Sequencher™ v4.9 (GENE CODES CORPORATION, Ann Arbor, MI) para ensamblar las secuencias en cíntigos más largos.

60 Un gen diana candidato que codifica *Diabrotica rnapll-140* (SEQ ID NO: 1) se identificó como un gen que puede conducir a la mortalidad de plagas de coleópteros, inhibición del crecimiento, inhibición del desarrollo o inhibición de la reproducción en WCR.

65 Genes con homología con WCR rnapll-140

En eucariotas existen tres clases de polimerasas de ARN (RNAP): RNAPI, que transcribe ARN ribosómico; RNAPII, que transcribe todos los genes que codifican proteínas, y RNAPIII, que transcribe los genes 5S ARNr y ARNr. Estas estructuras complejas constan de 9 a 14 subunidades, algunas de ellas son comunes entre las tres formas de polimerasas en todas las especies, mientras que otras son específicas de clase y especie. RNAPII de *Drosophila*

melanogaster consiste en al menos 12 subunidades separables electroforéticamente (Kramer and Bautz (1981) European Journal Biochemistry 117:449-455). Los genes de las dos subunidades más grandes son RplI140 (que codifica una subunidad Beta de 140 kDa) y RplI215 (que codifica una subunidad de 215 kDa). Se ha demostrado que ambos genes son esenciales para la viabilidad de *Drosophila*, lo que también es cierto para el gen que codifica una subunidad más pequeña (15 kDa) codificada por RplI15 (Falkenburg et al. (1987) Journal Molecular Biology 195:929-937; Jokerst et al. (1989) Molecular General Genetics 215:266-275; Harrison et al. (1992) Molecular and Cell Biology 12:928-935). Otra subunidad del gen (RplI18; Hamilton et al. (1993) Genetics 134:517-529), para la cual no se conocen mutaciones, codifica una proteína de 18 kDa.

10 En el presente documento se divultan secuencias diana y efectos letales de ARNi en *Diabrotica virgifera virgifera* rnapll-140 (Subunidad beta).

15 Genes con homología con rnapll-140 proporcionan una agrupación funcional para dianas de ARNi. Otras subunidades de RNAPII también son dianas de ARNi. Los transgenes de ARNdc de RNAPII se pueden combinar con otras moléculas de ARNdc para proporcionar una orientación de ARNi redundante y efectos sinérgicos de ARNi. Los eventos de maíz transgénico que expresan ARNdc dirigido a la producción de RNAPII-140 son útiles para prevenir daños por alimentación de raíces causados por el gusano de la raíz del maíz. Los transgenes de ARNdc de rnapll-140 representan nuevos modos de acción para combinarse con tecnología de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* en pirámides genéticas de manejo de la resistencia a los insectos para mitigar el desarrollo de 20 poblaciones de gusanos de la raíz resistentes a cualquiera de estas tecnologías de control de gusanos de la raíz.

Se utilizaron clones o parciales o de longitud completa de secuencias de un gen candidato de *Diabrotica*, en el presente documento denominado rnapll-140, para generar amplicones de PCR para la síntesis de ARNdc.

25 La SEQ ID NO: 1 muestra una secuencia de ADN de 3745 pb de *Diabrotica* rnapll-140.

La SEQ ID NO: 3 muestra una secuencia de ADN de 468 pb de reg1 rnapll.

La SEQ ID NO: 4 muestra una secuencia de ADN de 180 pb de reg2 rnapll.

30 La SEQ ID NO: 5 muestra una secuencia de ADN de 161 pb de reg3 rnapll.

#### Ejemplo 2

35 Amplificación de genes diana para producir ARNdc

Se diseñaron cebadores para amplificar porciones de regiones codificantes de cada gen diana mediante PCR. Véase Tabla 1. Cuando fue apropiado, se incorporó una secuencia promotora del fago T7 (TTAATACGACTCACTATAGGGAGA; SEQ ID NO: 6) en los extremos 5' de las cadenas con sentido o antisentido 40 amplificadas. Véase Tabla 1. Se extrajo el ARN total de WCR y se utilizó el ADNc de primera cadena como plantilla para las reacciones de PCR utilizando cebadores opuestos colocados para amplificar toda o parte de la secuencia del gen diana nativo. También se amplificó el ARNdc a partir de un clon de ADN que comprende la región codificante de una proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEQ ID NO: 7; Shagin et al. (2004) Mol. Biol. Evol. 21(5):841-50).

45 Tabla 1. Cebadores y pares de cebadores utilizados para amplificar porciones de regiones codificantes de gen diana rnapll-140 y gen de control negativo YFP de ejemplo.

|       | ID de gen   | ID de cebador  | SEQ ID NO: | Secuencia  |
|-------|-------------|----------------|------------|--|
| Par 1 | reg1 rnapll | ARNPreg1-F1 T7 | 8          | TTAATACGACTCACTATAGGGAG<br>ACCTACCCATTGGGAGAAAGAC        |
|       |             | ARNPreg1-R1 T7 | 9          | TTAATACGACTCACTATAGGGAG<br>AAGCAGCTTTTGATGGCC            |
| Par 2 | reg2 rnapll | ARNPreg2-F1 T7 | 10         | TTAATACGACTCACTATAGGGAG<br>AAAATAAGAGACTCGATTGGCT<br>G   |
|       |             | ARNPreg2-R1 T7 | 11         | TTAATACGACTCACTATAGGGAG<br>AGCGAGAGAACACCTCAGACC         |
| Par 3 | reg3 rnapll | ARNPreg3-F2 T7 | 12         | TTAATACGACTCACTATAGGGAG<br>ATTCTGCAGTAGAAAGAGGATT<br>TTC |
|       |             | ARNPreg3-R2 T7 | 13         | TTAATACGACTCACTATAGGGAG<br>AGTCGTCGTCTAATTATCGTAA<br>GG  |

|       |     |          |    |  |
|-------|-----|----------|----|--|
| Par 4 | YFP | YFP-F T7 | 14 | TTAATACGACTCACTATAGGGAG<br>ACACCATGGGCTCCAGCGCGCC<br>C |
|       |     | YFP-R T7 | 15 | TTAATACGACTCACTATAGGGAG<br>AAGATCTGAAGGCGCTTCAG<br>G   |

## Ejemplo 3

## Construcciones de ARNi

5 Preparación de plantillas mediante PCR y síntesis de ARNdc.

Una estrategia utilizada para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNdc de *rnapII-140* y YFP se muestra en la FIG. 1. Las plantillas de ADN destinadas para uso en la síntesis de ARNdc de *rnapII-140* se prepararon mediante PCR utilizando los pares de cebadores en Tabla 1 y ADNc de primera cadena (como plantilla de PCR) preparado a partir de ARN total aislado de larvas de primer estadio de WCR (YFP se amplificó a partir de un clon de ADN de una región codificante de YFP). Para cada región del gen diana de *rnapII-140* y YFP seleccionada, las amplificaciones por PCR introdujeron una secuencia promotora T7 en los extremos 5' de las cadenas con sentido y antisentido amplificadas. Los dos fragmentos amplificados por PCR para cada región de los genes diana se mezclaron 10 luego en cantidades aproximadamente iguales y la mezcla se utilizó como plantilla de transcripción para la producción de ARNdc. Véase la FIG. 1. Las secuencias de las plantillas de ARNdc amplificadas con los pares de cebadores particulares fueron: SEQ ID NO: 3 (reg1 *rnapII*), SEQ ID NO: 4 (reg2 *rnapII*), SEQ ID NO: 5 (reg3 *rnapII*) e YFP (SEQ ID NO: 7). Se sintetizó y purificó ARN de doble cadena para bioensayos en insectos utilizando un kit de ARN AMBION® MEGASCRIPTO® siguiendo las instrucciones del fabricante (INVITROGEN). Las concentraciones de 15 ARNdc se midieron utilizando un Espectrofotómetro NANODROP® 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE).

20

## Construcción de vectores de transformación vegetal

25 Vectores de entrada (pDAB115762 y pDAB115763) que albergan una construcción de gen diana para la formación de horquilla que comprende segmentos de *rnapII-140* (SEQ ID NO: 1) se ensamblaron utilizando una combinación de fragmentos sintetizados químicamente (DNA2.0, Menlo Park, CA) y métodos de clonación molecular estándar. La formación de horquillas intramoleculares mediante transcriptos primarias de ARN se facilitó al disponer (dentro de una única unidad de transcripción) dos copias de un segmento de gen diana en orientación opuesta entre sí, los dos segmentos se separaron por una secuencia de intrón ST-LS1 (SEQ ID NO: 19); Vancanneyt et al. (1990) Mol. Gen. Genet. 220(2):245-50). Por tanto, el transcripto de ARNm primario contiene las dos secuencias de segmentos de genes de *rnapII-140* como grandes repeticiones invertidas entre sí, separadas por la secuencia del intrón. Una copia de un promotor de ubiquitina 1 de maíz (Patente de EE.UU. No. 5,510,474) se utilizó para impulsar la producción del transcripto de horquilla de ARNm primario, y se utilizó un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un 30 gen de peroxidasa 5 de maíz (ZmPer5 3'UTR v2; Patente de EE.UU. No. 6,699,984) para terminar la transcripción del gen que expresa el ARN en horquilla.

35 El vector de entrada pDAB115762 comprende una construcción de ARN en horquilla (SEQ ID NO: 16) que comprende un segmento de *rnapII-140* (SEQ ID NO: 1)

40 El vector de entrada pDAB115763 comprende una construcción de ARN en horquilla (SEQ ID NO: 17) que comprende un segmento de *rnapII-140* (SEQ ID NO: 1) distinta de la encontrada en pDAB115762.

45 Los vectores de entrada pDAB115762 y pDAB115763 descritos anteriormente se utilizaron en reacciones de recombinación GATEWAY® estándar con un vector de destino binario típico (pDAB 109805) para producir vectores de transformación de expresión de ARN en horquilla para transformaciones de embriones de maíz mediadas por Agrobacterium (pDAB 114524 y pDAB114525, respectivamente).

50 Se construyó un vector binario de control negativo, pDAB110853, que comprende un gen que expresa un ARNdc en horquilla YFP, mediante el método reacciones de recombinación GATEWAY® estándar con un vector de destino binario típico (pDAB 109805) y un vector de entrada pDAB101670. El vector de entrada pDAB101670 comprende una secuencia en horquilla de YFP (SEQ ID NO: 18) bajo el control de la expresión de un promotor de ubiquitina 1 de maíz (como anteriormente) y un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen de peroxidasa 5 de maíz (como anteriormente).

55 El vector de destino binario pDAB109805 comprende un gen de resistencia a herbicidas (ariloxialquinoato dioxygenasa; AAD-1 v3) (Patente Estadounidense No. 7838733(B2), y Wright 20 et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107:20240-5) bajo la regulación de un fuerte promotor del badnavirus baciliforme de la caña de azúcar (ScBV) (Schenk et al. (1999) Plant Molec. Biol. 39:1221-30). Una secuencia 5'UTR sintética, compuesta por secuencias del gen 5'UTR de la proteína de cubierta del virus del rayado del maíz (MSV) y el intrón 6 de un gen del Alcohol Deshidrogenasa 1

(ADH1) del maíz, se coloca entre el extremo 3' del segmento promotor SCBV y el codón de inicio de la región codificante de AAD-1. Un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen de lipasa de maíz (ZmLip 3'UTR; Patente de EE.UU. No. 7,179,902) se utilizó para terminar la transcripción del ARNm de AAD-1.

- 5      Otro vector binario de control negativo, pDAB110556, que comprende un gen que expresa una proteína YFP, se construyó por medio de las reacciones de recombinación GATEWAY® estándar con un vector de destino binario típico (pDAB9989) y un vector de entrada pDAB100287. El vector de destino binario pDAB9989 comprende un gen de resistencia a herbicidas (ariloxialquinoato dioxygenasa; AAD-1 v3) (como anteriormente) bajo la regulación de la expresión de un promotor de ubiquitina 1 de maíz (como anteriormente) y un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen de lipasa de maíz (ZmLip 3'UTR; como anteriormente). El vector de entrada pDAB 100287 comprende una región codificante de YFP (SEQ ID NO: 20) bajo el control de la expresión de un promotor de ubiquitina 1 de maíz (como anteriormente) y un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen de peroxidasa 5 de maíz (como anteriormente).
- 10     La SEQ ID NO: 16 presenta una secuencia formadora de ARN en horquilla de rnapll-140 versión 1 como se encuentra en pDAB114524.
- 15     La SEQ ID NO: 17 presenta una secuencia formadora de ARN en horquilla versión de rnapll-140 2 como se encuentra en pDAB114525.

20     Ejemplo 4

Bioensayos de dieta de insectos

- 25     Preparación de muestras y bioensayos. Una serie de moléculas de ARNdc (que incluyen las correspondientes a reg1 rnapll (SEQ ID NO: 3), reg2 rnapll (SEQ ID NO: 4), y reg3 rnapll (SEQ ID NO: 5) se sintetizaron y purificaron utilizando un kit de ARNi MEGASCRIP®. Las moléculas de ARNdc purificadas se prepararon en tampón TE, y todos los bioensayos contenían un tratamiento de control que consistía en este tampón, que sirvió como verificación de antecedentes para la mortalidad o la inhibición del crecimiento de WCR (Diabrotica virgifera virgifera LeConte). Las concentraciones de moléculas de ARNdc en el tampón de bioensayo se midieron utilizando un espectrofotómetro NANODROP® 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE).

30     Se probaron muestras para determinar la actividad de los insectos en bioensayos realizados con larvas de insectos recién nacidos con dieta de insectos artificiales. Los huevos de WCR se obtuvieron de CROP CHARACTERISTICS, INC. (Farmington, Minnesota).

35     Los bioensayos se realizaron en bandejas de plástico de 128 pocillos diseñadas específicamente para bioensayos de insectos (CD INTERNATIONAL, Pitman, NJ). Cada pocillo contenía aproximadamente 1.0 ml de una dieta artificial diseñada para el crecimiento de insectos coleópteros. Se administró con una pipeta una alícuota de 60  $\mu$ l de muestra de ARNdc sobre la superficie de la dieta de cada pocillo (40  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>). Las concentraciones de muestras de ARNdc se calcularon como la cantidad de ARNdc por centímetro cuadrado (ng/cm<sup>2</sup>) de superficie (1.5 cm<sup>2</sup>) en el pocillo. Las bandejas tratadas se mantuvieron en una campana extractora hasta que el líquido de la superficie de la dieta se evaporó o fue absorbido por la dieta.

40     45     A las pocas horas de la eclosión, se recogieron las larvas individuales con un cepillo de pelo de camello humedecido y se depositaron en la dieta tratada (una o dos larvas por pocillo). Los pocillos infestados de las bandejas de plástico de 128 pocillos se sellaron con láminas adhesivas de plástico transparente y se ventilaron para permitir el intercambio de gases. Las bandejas de bioensayo se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas (28 °C, ~40 % de humedad relativa, 16:8 (luz: oscuridad)) durante 9 días, después de lo cual se midió el número total de insectos expuestos a cada muestra, el número de insectos muertos y se registró el peso de los insectos supervivientes. Se calcularon el porcentaje promedio de mortalidad y la inhibición promedio del crecimiento para cada tratamiento. La inhibición del crecimiento (GI) se calculó de la siguiente manera:

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

50     55     donde TWIT es el Peso Total de Insectos vivos en el Tratamiento; TNIT es el Número Total de Insectos en el Tratamiento; TWIBC es el Peso Total de Insectos Vivos en la Verificación de Antecedentes (control de Tampón); y TNIBC es el Número Total de Insectos en la Verificación de Antecedentes (control de Tampón).

60     65     El análisis estadístico se realizó utilizando software JMP® (SAS, Cary, NC).

La LC<sub>50</sub> (concentración letal) se define como la dosificación a la que muere el 50 % de los insectos de prueba. GI<sub>50</sub> (Inhibición del crecimiento) se define como la dosificación a la que el crecimiento medio (por ejemplo, peso vivo) de los insectos de prueba es el 50 % del valor medio observado en las muestras de verificación de antecedentes.

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

5 EJEMPLO 5

5 Cribado de genes diana candidatos

10 El ARNdc sintético diseñado para inhibir las secuencias de genes diana identificadas en el EJEMPLO 1 provocó mortalidad e inhibición del crecimiento cuando se administró a WCR en ensayos basados en dieta. Se observó que reg1 rnapll, reg2 rnapll y reg3 rnapll exhibían una eficacia mucho mayor en este ensayo que otros ARNdc cribados.

15 Los bioensayos replicados demostraron que la ingestión de preparaciones de ARNdc derivadas de reg1 rnapll, reg2 rnapll y reg3 rnapll dio como resultado la mortalidad y/o la inhibición del crecimiento de las larvas del gusano de la raíz del maíz occidental. La Tabla 2 y Tabla 3 muestran los resultados de los bioensayos de alimentación basados en dieta de larvas WCR después de una exposición de 9 días a estos ARNdc, así como los resultados obtenidos con una muestra de control negativo de ARNdc preparada a partir de una región codificante de proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEQ ID NO: 7).

20 Tabla 2. Resultados de ensayos de alimentación con dieta de ARNdc de rnapll-140 obtenidos con larvas del gusano de la raíz del maíz occidental después de 9 días de alimentación. El análisis ANOVA encontró diferencias significativas en el % medio de mortalidad y el % medio de inhibición del crecimiento (IG). Las medias se separaron mediante la prueba de Tukey-Kramer.

| Nombre del gen | Dosis (ng/cm <sup>2</sup> ) | No. Filas | % medio de mortalidad ± EEM* | IG medio ± EEM |
|----------------|-----------------------------|-----------|------------------------------|----------------|
| Reg1 rnapll    | 500                         | 4         | 97.06 ± 1.70 A               | 0.99 ± 0.00 A  |
| Reg2 rnapll    | 500                         | 10        | 85.23 ± 2.97 A               | 0.94 ± 0.02 A  |
| Reg3 rnapll    | 500                         | 10        | 89.35 ± 3.00 A               | 0.97 ± 0.02 A  |
| búfer TE       | 0                           | 12        | 7.27 ± 4.17 B                | 0.01 ± 0.04 B  |
| AGUA           | 0                           | 13        | 5.81 ± 2.11 B                | 0.01 ± 0.03 B  |
| YFP            | 500                         | 10        | 4.90 ± 1.80 B                | -0.08 ± 0.18 B |

\*EEM =Error Estándar de la Media. Las letras entre paréntesis designan niveles estadísticos. Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes (P<0.05).

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

\*\*\*YFP = Proteína fluorescente amarilla

25 Tabla 3. Resumen de la potencia oral de ARNdc de ARNII-140 en larvas WCR (ng/cm<sup>2</sup>).

| Nombre de la muestra | LC <sub>50</sub> | LC <sub>50</sub> Rango | GI <sub>50</sub> | GI <sub>50</sub> Rango |
|----------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| Reg1 rnapll          | 103.65           | 68.4-167.26            | 20.49            | 11.64-36.06            |
| Reg2 rnapll          | 6.71             | 4.37-9.83              | 4.29             | 1.76-10.45             |
| Reg3 rnapll          | 2.72             | 1.72-4.01              | 1.30             | 0.75-2.27              |

30 Anteriormente se había sugerido que ciertos genes de *Diabrotica* spp. se puede explotar para el control de insectos mediado por ARNi. Véase Publicación de patente de EE. UU. No. 2007/0124836, que divulga 906 secuencias, y Patente de EE.UU. No. 7,612,194, que divulga 9,112 secuencias. Sin embargo, se determinó que muchos genes que se sugiere que tienen utilidad para el control de insectos mediado por ARNi no son eficaces para controlar *Diabrotica*. También se determinó que las secuencias reg1 rnapll, reg2 rnapll y reg3 rnapll cada una proporciona un control superior sorprendente e inesperado de *Diabrotica*, en comparación con otros genes que se sugiere que tienen utilidad para el control de insectos mediado por ARNi.

35 35 Por ejemplo, anexina, beta espectrina 2 y mtRP-L4 se sugirieron en la Patente de EE.UU. No. 7,612,194 por ser eficaces en el control de insectos mediado por ARNi. La SEQ ID NO: 21 es la secuencia de ADN de la región de anexina 1 (Reg 1), y la SEQ ID NO: 22 es la secuencia de ADN de la región de anexina 2 (Reg 2). La SEQ ID NO: 23 es la secuencia de ADN de la región 1 de beta espectrina 2 (Reg 1), y la SEQ ID NO: 24 es la secuencia de ADN de la región 2 de beta espectrina 2 (Reg2). La SEQ ID NO: 25 es la secuencia de ADN de la región 1 de mtRP-L4 (Reg 1), y la SEQ ID NO: 26 es la secuencia de ADN de la región 2 de mtRP-L4 (Reg 2). También se utilizó una secuencia YFP (SEQ ID NO: 7) para producir ARNdc como control negativo.

40 45 Cada una de las secuencias mencionadas anteriormente se utilizó para producir ARNdc mediante los métodos del EJEMPLO 3. La estrategia utilizada para proporcionar plantillas específicas para la producción de ARNdc se muestra en la FIG. 2. Los ADN de plantilla destinados para uso en la síntesis de ARNdc se prepararon mediante PCR utilizando los pares de cebadores en Tabla 4 y ADNc de primera cadena (como plantilla de PCR) preparado a partir de ARN total aislado de larvas de primer estadio de WCR. (YFP se amplificó a partir de un clon de ADN). Para cada región del gen diana seleccionada, se realizaron dos amplificaciones por PCR separadas. La primera amplificación por PCR introdujo

una secuencia promotora de T7 en el extremo 5' de las cadenas codificantes amplificadas. La segunda reacción incorporó la secuencia del promotor T7 en los extremos 5' de las cadenas antisentido. Los dos fragmentos amplificados por PCR para cada región de los genes diana se mezclaron luego en cantidades aproximadamente iguales y la mezcla se utilizó como plantilla de transcripción para la producción de ARNdc. Véase FIG. 2. Se sintetizó y purificó ARN de doble cadena utilizando un kit de ARNi AMBION® MEGAscript® siguiendo las instrucciones del fabricante (INVITROGEN). Las concentraciones de ARNdc se midieron utilizando un espectrofotómetro NANODROP® 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE) y cada uno de los ARNdc se probó mediante los mismos métodos de bioensayo basados en la dieta descritos anteriormente. La Tabla 4 enumera las secuencias de los cebadores utilizados para producir las moléculas de ARNdc de anexina Reg1, anexina Reg2, beta espectrina 2 Reg1, beta espectrina 2 Reg2, mtRP-L4 Reg1 y mtRP-L4 Reg2. Las secuencias de cebador YFP para uso en el método representadas en la FIG. 2 también se enumeran en Tabla 4. La Tabla 5 presenta los resultados de bioensayos de alimentación basados en la dieta de larvas de WCR después de una exposición de 9 días a estas moléculas de ARNdc. Los bioensayos replicados demostraron que la ingestión de estos ARNdc no produjo mortalidad ni inhibición del crecimiento de las larvas del gusano de la raíz del maíz occidental por encima de lo observado con muestras de control de tampón TE, agua o proteína YFP.

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

|        | Gen (Región)        | ID de cebador | SEQ ID NO: | Secuencia   |
|--------|---------------------|---------------|------------|---|
| Par 5  | Anexina (Reg 1)     | En-F1_T7      | 27         | TTAATACGACTCACTATAGGGA<br>GAGCTCCAACAGTGGTCTTATC              |
|        | Anexina (Reg 1)     | Ann-R1        | 28         | CTAATAATTCTTTTTAATGTTCC<br>TGAGG                              |
| Par 6  | Anexina (Reg 1)     | En F1         | 29         | GCTCCAACAGTGGTCTTATC  |
|        | Anexina (Reg 1)     | Ann-R1_T7     | 30         | TTAATACGACTCACTATAGGGA<br>GACTAATAATTCTTTTTAATGTT<br>TCCTGAGG |
| Par 7  | Anexina (Reg 2)     | Ann-F2_T7     | 31         | TTAATACGACTCACTATAGGGA<br>GATTGTTACAAGCTGGAGAACTT<br>CTC      |
|        | Anexina (Reg 2)     | Ann-R2        | 32         | CTTAACCAACAACGGCTAATAA<br>GG                                  |
| Par 8  | Anexina (Reg 2)     | Ann-F2        | 33         | TTGTTACAAGCTGGAGAACTTCT<br>C                                  |
|        | Anexina (Reg 2)     | Ann-R2T7      | 34         | TTAATACGACTCACTATAGGGA<br>GACTTAACCAACAACGGCTAAT<br>AAGG      |
| Par 9  | Beta-spect2 (Reg 1) | Betasp2-F1_T7 | 35         | TTAATACGACTCACTATAGGGA<br>GAAGATGTTGGCTGCATCTAGA<br>GAA       |
|        | Beta-spect2 (Reg 1) | Betasp2-R1    | 36         | GTCCATTCTGCCATCCACTGCA  |
| Par 10 | Beta-spect2 (Reg 1) | Betasp2-F1    | 37         | AGATGTTGGCTGCATCTAGAGA<br>A                                   |
|        | Beta-spect2 (Reg 1) | Betasp2-R1_T7 | 38         | TTAATACGACTCACTATAGGGA<br>GAGTCCATTCTGCCATCCACTGCA<br>A       |
| Par 11 | Beta-spect2 (Reg 2) | Betasp2-F2_T7 | 39         | TTAATACGACTCACTATAGGGA<br>GAGCAGATGAACACCAGCGAGA<br>AA        |
|        | Beta-spect2 (Reg 2) | Betasp2-R2    | 40         | CTGGGCAGCTTCTGTTTCCTC   |
| Par 12 | Beta-spect2 (Reg 2) | Betasp2-F2    | 41         | GCAGATGAACACCAGCGAGAAA  |
|        | Beta-spect2 (Reg 2) | Betasp2-R2_T7 | 42         | TTAATACGACTCACTATAGGGA<br>GACTGGCAGCTTCTGTTTCCT<br>C          |

|           |                 |          |    |   |
|-----------|-----------------|----------|----|---|
| Par<br>13 | mtRP-L4 (Reg 1) | L4-F1 T7 | 43 | TTAATACGACTCACTATAGGGA<br>GAAGTGAAATGTTAGCAAATAT<br>AACATCC |
|           | mtRP-L4 (Reg 1) | L4-R1    | 44 | ACCTCTCACTTCAAATCTTGA<br>CTTG                               |
| Par<br>14 | mtRP-L4 (Reg 1) | L4-F1    | 45 | AGTGAAATGTTAGCAAATATAA<br>CATCC                             |
|           | mtRP-L4 (Reg 1) | L4-R1 T7 | 46 | TTAATACGACTCACTATAGGGA<br>GAACCTCTCACTTCAAATCTTGA<br>CTTG   |
| Par<br>15 | mtRP-L4 (Reg 2) | L4-F2 T7 | 47 | TTAATACGACTCACTATAGGGA<br>GACAAAGTCAAGATTGAAGTG<br>AGAGGT   |
|           | mtRP-L4 (Reg 2) | L4-R2    | 48 | CTACAAATAAAACAAGAAGGAC<br>CCC                               |
| Par<br>16 | mtRP-L4 (Reg 2) | L4-F2    | 49 | CAAAGTCAAGATTGAAGTGAG<br>AGGT                               |
|           | mtRP-L4 (Reg 2) | L4-R2 T7 | 50 | TTAATACGACTCACTATAGGGA<br>GACTACAAATAAAACAAGAAGG<br>ACCC    |

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

| Nombre del gen          | Dosis (ng/cm <sup>2</sup> ) | Peso medio de larvas vivas (mg) | % medio de mortalidad | Inhibición media del crecimiento |
|-------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| Anexina-Reg 1           | 1000                        | 0.545                           | 0                     | -0.262                           |
| Anexina-Reg 2           | 1000                        | 0.565                           | 0                     | -0.301                           |
| Beta espectrina 2 Reg 1 | 1000                        | 0.340                           | 12                    | -0.014                           |
| Beta espectrina 2 Reg 2 | 1000                        | 0.465                           | 18                    | -0.367                           |
| mtRP-L4 Reg 1           | 1000                        | 0.305                           | 4                     | -0.168                           |
| mtRP-L4 Reg 2           | 1000                        | 0.305                           | 7                     | -0.180                           |
| Tampón TE*              | 0                           | 0.430                           | 13                    | 0.000                            |
| Agua                    | 0                           | 0.535                           | 12                    | 0.000                            |
| YFP**                   | 1000                        | 0.480                           | 9                     | -0.386                           |

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

\*\*YFP = Proteína Fluorescente Amarilla

- 5 Ejemplo 6
- Producción de tejidos de maíz transgénico que comprenden insecticidas de ARNdc en forma de horquilla
- 10 10 Transformación mediada por Agrobacterium: Las células, tejidos y plantas de maíz transgénicos que producen una o más moléculas de ARNdc insecticidas (por ejemplo, al menos una molécula de ARNdc que incluye una molécula de ARNdc dirigida a un gen que comprende map11-140; SEQ ID NO: 1) mediante la expresión de un gen químérico integrado de forma estable en el genoma de la planta se produjeron siguiendo la transformación mediada por Agrobacterium. Los métodos de transformación de maíz que emplean vectores de transformación superbinarios o binarios son conocidos en la técnica, como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. No. 8,304,604. Los tejidos transformados se seleccionaron por su capacidad para crecer en un medio que contenía Haloxifop y se cribaron para determinar la producción de ARNdc, según correspondiera. Se pueden presentar porciones de dichos cultivos de tejido transformados a larvas recién nacidas del gusano de la raíz del maíz para su bioensayo, esencialmente como se describe en el EJEMPLO 1.
- 20 20 Inicio del cultivo de Agrobacterium: Reservas de glicerol de células DAt13192 de cepas de Agrobacterium (Documento WO 2012/016222A2) que alberga un vector de transformación binario pDAB114524, pDAB114525, pDAB110853 o pDAB110556 descrito anteriormente (EJEMPLO 4) se sembraron en placas de medio mínimo AB (Watson et al., (1975) J. Bacteriol. 123:255-264) que contenían antibióticos apropiados y se cultivaron a 20 °C durante 3 días. Luego, los cultivos se sembraron en placas YEP (gm/l: extracto de levadura, 10; peptona, 10; NaCl 5) que contenían los mismos antibióticos y se incubaron a 20 °C durante 1 día.

Cultivo de Agrobacterium: En el día del experimento, se preparó una solución madre de Medio de Inoculación y acetosiringona en un volumen apropiado para el número de construcciones en el experimento y se pipeteó en un matraz estéril y desecharable de 250 ml. El Medio de inoculación (Frame et al. (2011) *Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos*. IN *Plant Embryo Culture Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. T. A Thorpe and E. C. Yeung, (Eds), Springer Science and Business Media, LLC. pp 327-341) contenía: 2.2 g/l de sales MS; Vitaminas MS Modificada 1 X ISU (Frame et al., ibidem.) 68.4 g/l de sacarosa; 36 g/l de glucosa; 115 mg/l de L-prolina; y 100 mg/l de mioinositol; a pH 5.4.)

Se agregó acetosiringona al matraz que contenía el Medio de Inoculación hasta una concentración final de 200  $\mu$ M a partir de una solución madre 1 M en sulfóxido de dimetilo al 100 % y la solución se mezcló completamente.

Para cada construcción, 1 o 2 bucles de inoculación llenas de Agrobacterium de la placa YEP se suspendieron en 15 ml de la solución madre de Medio de Inoculación/acetosiringona en un tubo de centrífuga de 50 ml, desecharable y estéril, y la densidad óptica de la solución a 550 nm ( $OD_{550}$ ) se midió en un espectrofotómetro. Luego la suspensión se diluyó hasta  $OD_{550}$  de 0.3 a 0.4 utilizando una mezcla adicional de medio de inoculación/acetosiringona. Luego se colocó el tubo de suspensión de Agrobacterium horizontalmente en una plataforma agitadora ajustada a aproximadamente 75 rpm a temperatura ambiente y se agitó durante 1 a 4 horas mientras se realizaba la disección del embrión.

Esterilización de mazorcas y aislamiento de embriones: Los embriones inmaduros de maíz se obtuvieron de plantas de *Zea mays* línea endogámica B104 (Hallauer et al. (1997) *Crop Science* 37: 1405-1406) cultivadas en invernadero y autopolinizadas o polinizadas por hermanos para producir mazorcas. Las mazorcas se cosecharon aproximadamente entre 10 y 12 días después de la polinización. El día del experimento, las mazorcas descascarilladas se esterilizaron superficialmente mediante inmersión en una solución al 20 % de lejía comercial (Lejía germicida ULTRA CLOROX®, hipoclorito de sodio al 6.15 %; con dos gotas de TWEEN 20) y se agitó durante 20 a 30 min, seguido de tres enjuagues en agua desionizada estéril en campana de flujo laminar. Se diseccionaron asépticamente embriones cigóticos inmaduros (de 1.8 a 2.2 mm de largo) de cada mazorca y se distribuyeron aleatoriamente en tubos de microcentrifuga que contenían 2.0 ml de una suspensión de células de Agrobacterium en medio de inoculación líquido con acetosiringona 200  $\mu$ M, en la que se han agregado 2  $\mu$ l de tensioactivo BREAK-THRU® S233 al 10 % (EVONIK INDUSTRIES; Essen, Alemania). Para un conjunto determinado de experimentos, se utilizaron embriones de mazorcas agrupadas para cada transformación.

Cocultivo de Agrobacterium: Tras el aislamiento, los embriones se colocaron en una plataforma basculante durante 5 minutos. Luego se vertió el contenido del tubo sobre una placa de medio de cocultivo, que contenía 4.33 g/l de sales MS; Vitaminas MS Modificada 1 X ISU; 30 g/l de sacarosa; 700 mg/l de L-prolina; 3,3 mg/l de dicamba en KOH (ácido 3,6-dicloro-o-anísico o ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico); 100 mg/l de mioinositol; 100 mg/l de hidrolizado enzimático de caseína; 15 mg/l de AgNO<sub>3</sub>; acetosiringona 200  $\mu$ M en DMSO; y 3 g/ml de GELZAN™, a pH 5.8. La suspensión de Agrobacterium líquida se eliminó con una pipeta de transferencia desecharable y estéril. Luego, los embriones se orientaron con el escutelo hacia arriba utilizando unas pinzas estériles con la ayuda de un microscopio. La placa se cerró, se selló con cinta médica 3M® MICROPORO® y se colocó en una incubadora a 25 °C con luz continua de aproximadamente 60  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> de Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR).

Selección de callos y regeneración de eventos transgénicos: Despues del período de cocultivo, los embriones se transfirieron a un medio de reposo, que estaba compuesto de 4.33 g/l de sales MS; Vitaminas MS Modificada 1 X ISU; 30 g/l de sacarosa; 700 mg/l de L-prolina; 3.3 mg/l de dicamba en KOH; 100 mg/l de mioinositol; 100 mg/l de hidrolizado enzimático de caseína; 15 mg/l de AgNO<sub>3</sub>; 0.5 g/l de MES (monohidrato de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; PHYTO TECHNOLOGIES LABR.; Lenexa, KS); 250 mg/l de Carbenicilina; y 2.3 g/l de GELZAN™; a pH 5.8. No se trasladaron más de 36 embriones a cada placa. Las placas se colocaron en una caja de plástico transparente y se incubaron a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> PAR durante 7 a 10 días. Luego se transfirieron los embriones callosos (<18/placa) al Medio de Selección I, que estaba compuesto por el Medio de Reposo (arriba) con ácido R-Haloxifop 100 nM (0.0362 mg/l; para la selección de callos que albergan el gen AAD-1). Las placas se devolvieron a cajas transparentes y se incubaron a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> PAR por 7 días. Luego se transfirieron los embriones callosos (<12/placa) al medio de selección II, que se compone de medio de reposo (arriba) con ácido R-haloxifop 500 nM (0.181 mg/l). Las placas se devolvieron a cajas transparentes y se incubaron a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> PAR durante 14 días. Esta etapa de selección permitió que los callos transgénicos proliferaran y se diferenciaran aún más.

Se transfirieron callos embrionarios en proliferación (<9/placa) a medio de prerregeración. El medio de prerregeración contenía 4.33 g/l de sales MS; Vitaminas MS Modificada 1 X ISU; 45 g/l de sacarosa; 350 mg/l de L-prolina; 100 mg/l de mioinositol; 50 mg/l de hidrolizado enzimático de caseína; 1.0 mg/l de AgNO<sub>3</sub>; 0.25 g/l de MES; 0.5 mg/l de ácido naftaleñoacético 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 almacenaron en cajas transparentes y se incubaron a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> PAR durante 7 días. Luego se transfirieron los callos en regeneración (<6/placa) al medio de regeneración en PHYTATRAYS™ (SIGMA-ALDRICH) y se incubaron a 28 °C con 16 horas de luz/8 horas de oscuridad por día (a aproximadamente 160  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> PAR) durante 14 días o hasta que se desarrollen brotes y raíces. El medio de regeneración contenía 4.33 g/l de sales MS; 1 vitamina MS modificada por ISU; 60 g/l de sacarosa; 100 mg/l de mioinositol; 125 mg/l de

carbenicilina; 3 g/l GELLAN™ chicle; y 0,181 mg/l de ácido R-haloxifop; a pH 5.8. Luego se aislaron pequeños brotes con raíces primarias y se transfirieron a medio de elongación sin selección. El medio de elongación contenía 4.33 g/l de sales MS; Vitaminas MS Modificada 1 X ISU; 30 g/l de sacarosa; y 3.5 g/l de GELRITE®: a pH 5.8.

- 5 Se trasplantaron brotes de plantas transformados seleccionados por su capacidad para crecer en un medio que contenía Haloxifop de PHYTATRAYS™ a macetas pequeñas llenas de sustrato de cultivo (PROMIX BX; PREMIER TECH HORTICULTURE), cubiertas con copas o HUMI-DOMES (ARCO PLASTICS), y luego se endurecieron en una cámara de crecimiento CONVIRON (27 °C día/24 °C noche, fotoperíodo de 16 horas, 50-70 % RH, 200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR). En algunos casos, se analizó el número relativo de copias del transgén en supuestas plántulas transgénicas mediante ensayos cuantitativos de PCR en tiempo real utilizando cebadores diseñados para detectar el gen de tolerancia al herbicida AAD1 integrado en el genoma del maíz. Además, se utilizaron ensayos de qPCR de ARN para detectar la presencia de la secuencia del intrón ST-LS1 en ARNdc expresados de transformantes putativos. Luego, las plántulas transformadas seleccionadas se trasladaron a un invernadero para su posterior crecimiento y pruebas.
- 10 15 Transferencia y establecimiento de plantas  $T_0$  en invernadero para bioensayo y producción de semillas: Cuando las plantas alcanzaron la etapa V3-V4, se trasplantaron a una mezcla de suelo IE CUSTOM BLEND (PROFILE/METRO MIX 160) y se cultivaron hasta florecer en el invernadero (Tipo de exposición a la luz: Foto o Asimilación; Límite de luz alto: 1200 PAR; duración del día de 16 horas; 27 °C día/24 °C noche).
- 20 25 Las plantas que se utilizarán para bioensayos de insectos se trasplantaron de macetas pequeñas a TINUS™ 350-4 ROOTTRAINERS® (SPENCER-LEMAIRE INDUSTRIES, Acheson, Alberta, Canadá) (una planta por evento por ROOTRAINER®). Aproximadamente cuatro días después del trasplante a ROOTTRAINERS®, las plantas fueron infestadas para el bioensayo.
- 30 35 Plantas de la generación  $T_1$  se obtuvieron al polinizar las fibras de plantas transgénicas  $T_0$  con el polen recolectado de plantas de la línea endogámica de élite no transgénica B104 u otros donantes de polen apropiados, y plantar las semillas resultantes. Cuando fue posible se realizaron cruces recíprocos.

#### Ejemplo 7

- 30 Análisis moleculares de tejidos de maíz transgénico
- 35 Análisis moleculares (por ejemplo qPCR de ARN) de tejidos de maíz se realizó en muestras de hojas y raíces recolectadas de plantas cultivadas en invernadero los mismos días en que se evaluó el daño por alimentación de las raíces.
- 40 45 Los resultados de los ensayos de qPCR de ARN para Per5 3'UTR se utilizaron para validar la expresión de transgenes en horquilla. (Se espera un nivel bajo de detección de 3'UTR de Per5 en plantas de maíz no transformadas, ya que generalmente hay expresión del gen Per5 endógeno en los tejidos del maíz). Los resultados de los ensayos de qPCR de ARN para la secuencia del intrón ST-LS1 (que es parte integral de la formación de moléculas de horquilla de ARNdc) en los ARN expresados se utilizaron para validar la presencia de transcriptos de horquilla. Los niveles de expresión del ARN transgén se midieron en relación con los niveles de ARN de un gen endógeno del maíz.
- 50 55 Se utilizaron análisis de qPCR de ADN para detectar una porción de la región codificante de AAD1 en el ADN genómico para estimar el número de copias de inserción del transgén. Las muestras para estos análisis se recolectaron de plantas cultivadas en cámaras ambientales. Los resultados se compararon con los resultados de qPCR de ADN de ensayos diseñados para detectar una porción de un gen nativo de copia única, y se avanzaron eventos simples (que tenían una o dos copias de los transgenes) para estudios adicionales en el invernadero.
- 60 65 Adicionalmente, se utilizaron ensayos de qPCR diseñados para detectar una porción del gen de resistencia a la espectinomicina (SpecR; alojado en los plásmidos del vector binario fuera del ADN-T) para determinar si las plantas transgénicas contenían secuencias principales de plásmidos integradas extrañas.
- 70 Nivel de expresión de transcripto de ARN en horquilla: Per qPCR 5 3'UTR: Los eventos de células de callo o plantas transgénicas se analizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de la secuencia Per 5 3'UTR para determinar el nivel de expresión relativo del transcripto en horquilla de longitud completa, en comparación con el nivel de transcripto de un gen interno del maíz (SEQ ID NO. 51; GENBANK® No. de acceso BT069734), que codifica una proteína similar a TIP41 (es decir un homólogo de maíz de GENBANK® Número de acceso AT4G34270; que tiene una puntuación tBLASTX del 74% de identidad). El ARN se aisló utilizando un Kit RNAEASY™ 96 (QIAGEN, Valencia, CA). Después de la elución, el ARN total se sometió a un tratamiento con ADNasa 1 de acuerdo con el protocolo sugerido por el kit. Luego se cuantificó el ARN en un espectrofotómetro NANODROP® 8000 (THERMO SCIENTIFIC) y la concentración se normalizó a 25 ng/ $\mu\text{l}$ . El ADNc de la primera cadena se preparó utilizando un KIT DE SÍNTESIS DE ADNc DE ALTA CAPACIDAD (INVITROGEN) en un volumen de reacción de 10  $\mu\text{l}$  con 5  $\mu\text{l}$  de ARN desnaturalizado, sustancialmente de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. El protocolo se modificó ligeramente para incluir la adición de 10  $\mu\text{l}$  de oligonucleótido (IDT) T20VN 100  $\mu\text{M}$  (SEQ ID NO: 52; TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN,

donde V es A, C o G, y N es A, C, G o T. /U) en el tubo de 1 ml de mezcla de stock de cebadores aleatorios, para preparar una reserva de trabajo de cebadores aleatorios combinados y oligo dT.

Después de la síntesis de ADNc, las muestras se diluyeron 1:3 con agua libre de nucleasas y se almacenaron a -20 °C hasta su ensayo.

Se realizaron ensayos de PCR en tiempo real separados para el transcripto similar a Per5 3' UTR y TIP41 en un LIGHTCYCLER® 480 (ROCHE DIAGNOSTICS, Indianápolis, IN) en volúmenes de reacción de 10 µl. Para el ensayo Per5 3'UTR, las reacciones se realizaron con los cebadores P5U76S (F) (SEQ ID NO: 53) y P5U76A (R) (SEQ ID NO: 54) y ROCHE UNIVERSAL PROBE™ (UPL76; No. de catálogo 4889960001; etiquetado con FAM). Para el ensayo del gen de referencia similar a TIP41, se utilizaron los cebadores TIPmxF (SEQ ID NO: 55) y TIPmxR (SEQ ID NO: 56), y la sonda HXTIP (SEQ ID NO: 57) marcada con HEX (hexaclorofluoresceína).

Todos los ensayos incluyeron controles negativos sin plantilla (solo mezcla). Para las curvas estándar, también se incluyó un blanco (agua en el pocillo fuente) en la placa fuente para verificar la contaminación cruzada de la muestra. Las secuencias de cebadores y sondas se exponen en Tabla 6. Las recetas de los componentes de reacción para la detección de los diversos transcriptos se divulan en Tabla 7, y las condiciones de las reacciones de PCR se resumen en Tabla 8. La fracción fluorescente FAM (6-carboxifluoresceína amidita) se excitó a 465 nm y la fluorescencia se midió a 510 nm; los valores correspondientes para la fracción fluorescente HEX (hexaclorofluoresceína) fueron 533 nm y 580 nm.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para análisis moleculares de niveles de transcriptos en maíz transgénico.

| Diana      | Oligonucleótido         | SEQ ID NO. | Secuencia   |
|------------|-------------------------|------------|---|
| Per5 3'UTR | P5U76S (F)              | 53         | TTGTGATGTTGGTGGCGTAT                              |
| Per5 3'UTR | P5U76A (R)              | 54         | TGTTAAATAAAACCCCAAAGATCG                          |
| Per53'UTR  | Roche UPL76 (sonda FAM) | NAv**      | Número de catálogo de Roche Diagnostics 488996001 |
| TIP41      | TIPmxF                  | 55         | TGAGGGTAATGCCAACTGGTT                             |
| TIP41      | TIPmxR                  | 56         | GCAATGTAACCGAGTGTCTCTCAA                          |
| TIP41      | HXTIP (sonda HEX)       | 57         | TTTTTGGCTTAGAGTTGATGGTGTACT GATGA                 |

\*Proteína similar a TIP41. \*\*Secuencia NAv No disponible del proveedor.

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

| Componente        | Per5 3'UTR          | Gen tipo TIP |
|-------------------|---------------------|--------------|
|                   | Concentración final |              |
| Tampón de Roche   | 1X                  | 1X           |
| P5U76S (F)        | 0.4 µM              | 0            |
| P5U76A (R)        | 0.4 µM              | 0            |
| Roche UPL76 (FAM) | 0.2 µM              | 0            |
| HEXtipZM F        | 0                   | 0.4 µM       |
| HEXtipZM R        | 0                   | 0.4 µM       |
| HEXtipZM (HEX)    | 0                   | 0.2 µM       |
| ADNc (2.0 µl)     | NA                  | NA           |
| Aqua              | A 10 µl             | A 10 µl      |

Tabla 8. Condiciones del termociclador para qPCR de ARN.

| Per5 3'UTR y detección de genes similares a TIP41 |              |            |            |
|---|--------------|------------|------------|
| Proceso   | Temperatura. | Tiempo     | No. Ciclos |
| Activación diana                                  | 95 °C        | 10 minutos | 1          |
| Desnaturalizar                                    | 95 °C        | 10 s       | 40         |
| Extender  | 60 °C        | 40 s       |            |
| Adquirir FAM o HEX                                | 72 °C        | 1 s        |            |
| Enfriar   | 40 °C        | 10 s       | 1          |

Los datos se analizaron utilizando Software LIGHTCYCLER® v1.5 para cuantificación relativa utilizando un algoritmo máximo de segunda derivada para el cálculo de los valores de Cq de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Para los análisis de expresión, los valores de expresión se calcularon utilizando el método  $\Delta\Delta Ct$  (es decir,  $2^{-(Cq_{TARGET} - Cq_{REF})}$ ), que se basa en la comparación de diferencias de valores de Cq entre dos dianas, el valor base

30

de 2 se selecciona bajo el supuesto de que, para reacciones de PCR optimizadas, el producto se duplica en cada ciclo.

- 5 Tamaño e integridad del transcripto en horquilla - Ensayo de transferencia Northern: En algunos casos, se obtiene una caracterización molecular adicional de las plantas transgénicas mediante el uso de análisis de transferencia Northern (transferencia de ARN) para determinar el tamaño molecular del ARN en horquilla de rnapl1-140 en plantas transgénicas que expresan un ARNdc en horquilla de rnapl1-140.
- 10 Todos los materiales y equipos se tratan con RNAZAP (AMBION/INVITROGEN) antes de su uso. Se recogen muestras de tejido (de 100 mg a 500 mg) en tubos SAFELOCK EPPENDORF de 2 ml, disgregados con un pulverizador de tejido KLECKO™ (GARCIA MANUFACTURING, Visalia, CA) con tres perlas de tungsteno en 1 ml de TRIZOL (INVITROGEN) durante 5 min, luego se incubó a temperatura ambiente (T.Amb.) durante 10 min. Opcionalmente, las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 4 °C a 11,000 rpm y el sobrenadante se transfiere a un tubo SAFELOCK EPPENDORF nuevo de 2 ml. Después de agregar 200 µl de cloroformo al homogeneizado, el tubo se mezcla por inversión durante 2 a 5 minutos, se incuba a T.Amb. durante 10 minutos y se centrifuga a 12,000 x g durante 15 minutos a 4 °C. La fase superior se transfiere a un tubo EPPENDORF estéril de 1.5 ml, se agregan 600 µl de isopropanol al 100 %, seguido de una incubación a temperatura T.Amb. 10 min a 2 h, luego se centrifuga a 12,000 x g durante 10 min a 4 °C a 25 °C. Se descarta el sobrenadante y el sedimento de ARN se lava dos veces con 1 ml de etanol al 70 %, con centrifugación a 7,500 x g durante 10 min a 4 °C a 25 °C entre lavados. Se desecha el etanol y el sedimento se seca brevemente al aire durante 3 a 5 minutos antes de resuspenderlo en 50 µl de agua libre de nucleasas.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- El ARN total se cuantifica utilizando el NANODROP® 8000 (THERMO-FISHER) y las muestras se normalizan a 5 µg/10 µl. Luego se agregan 10 µl de glicoxal (AMBION/INVITROGEN) a cada muestra. Se dispensan de cinco a 14 ng de mezcla de marcadores estándar DIG RNA (ROCHE APPLIED SCIENCE, Indianápolis, IN) y se agregan a un volumen igual de glicoxal. Las muestras y los ARN marcadores se desnaturalizan a 50 °C durante 45 min y se almacenan en hielo hasta su carga en un gel de agarosa SEAKEM GOLD (LONZA, Allendale, NJ) al 1.25 % en tampón de ejecución de glicoxal NORTHERNMAX 10 X (AMBION/INVITROGEN). Los ARN se separan por electroforesis a 65 voltios/30 mA durante 2 h y 15 min.
- Después de la electroforesis, el gel se enjuaga en 2X SSC durante 5 minutos y se obtienen imágenes en una estación GEL DOC (BIORAD, Hercules, CA), luego el ARN se transfiere pasivamente a una membrana de nailon (MILLIPORE) durante la noche a T.Amb., utilizando 10X SSC como tampón de transferencia (20X SSC consiste en cloruro de sodio 3 M y citrato trisódico 300 mM, pH 7.0). Después de la transferencia, la membrana se enjuaga en 2X SSC durante 5 minutos, el ARN se entrecruza mediante UV con la membrana (AGILENT/STRATAGENE) y la membrana se deja secar a temperatura ambiente durante hasta 2 días.
- La membrana se prehibrida en tampón ULTRAHYB (AMBION/INVITROGEN) durante 1 a 2 horas. La sonda consiste en un producto amplificado por PCR que contiene la secuencia de interés (por ejemplo, la porción de la secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17, según corresponda) marcado con digoxigenina mediante 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 transferencia se somete a lavados DIG, se envuelve, se expone a una película durante 1 a 30 minutos y luego se revela la película, todo mediante los métodos recomendados por el proveedor del kit DIG.
- Determinación del número de copias del transgén.
- Se recogieron trozos de hojas de maíz aproximadamente equivalentes a 2 perforaciones de hojas en placas de recolección de 96 pocillos (QIAGEN). La disruptión del tejido se realizó con un pulverizador de tejido KLECKO™ (GARCIA MANUFACTURING, Visalia, CA) en tampón de lisis BIOSPRINT96 AP1 (suministrado con un KIT DE PLANTA BIOSPRINT96; QIAGEN) con una cuenta de acero inoxidable. Después de la maceración del tejido, se aisló ADN genómico (ADNg) en un formato de alto rendimiento utilizando un KIT DE PLANTA BIOSPRINT96 y un robot de extracción BIOSPRINT96. El ADN genómico se diluyó 2:3 ADN:agua antes de configurar la reacción qPCR.
- Análisis Qpcr. La detección del transgén mediante ensayo de sonda de hidrólisis se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando un sistema LIGHTCYCLER® 480. Oligonucleótidos para utilizar en ensayos de sonda de hidrólisis para detectar la secuencia del intrón ST-LS1 (SEQ ID NO: 19), o para detectar una porción del gen SpecR (es decir el gen de resistencia a espectinomicina contenido en los plásmidos del vector binario; SEQ ID NO: 58; oligonucleótidos SPC1 en la Tabla 9), se diseñaron utilizando LIGHTCYCLER® PROBE DESIGN SOFTWARE 2.0. Además, los oligonucleótidos que se utilizarán en ensayos de sonda de hidrólisis para detectar un segmento del gen de tolerancia al herbicida AAD-1 (SEQ ID NO: 59; oligonucleótidos GAAD1 en la Tabla 9) se diseñaron utilizando el software PRIMER EXPRESS (APPLIED BIOSYSTEMS). La Tabla 9 muestra las secuencias de los cebadores y sondas. Los ensayos se multiplexaron con reactivos para un gen cromosómico de maíz endógeno (Invertasa (SEQ ID NO: 60); GENBANK® Número de Acceso: U16123; denominado en este documento IVR1), que sirvió como secuencia de referencia interna para garantizar que el ADNg estuviera presente en cada ensayo. Para amplificación, se preparó la mezcla LIGHTCYCLER® 480 PROBES MASTER (ROCHE APPLIED SCIENCE) a una concentración final de 1x en una reacción múltiple de volumen de 10 µl que contenía 0.4 µM de cada cebador y 0.2 µM de cada sonda. (Tabla 10).

Se realizó una reacción de amplificación de dos etapas como se describe en Tabla 11. La activación y emisión de fluoróforos para las sondas marcadas con FAM y HEX fueron como se describió anteriormente; Los conjugados de CY5 se excitan al máximo a 650 nm y tienen una fluorescencia máxima a 670 nm.

- 5 Las puntuaciones de Cp (el punto en el que la señal de fluorescencia cruza el umbral de fondo) se determinaron a partir de los datos de PCR en tiempo real utilizando el algoritmo de puntos de ajuste (LIGHTCYCLER® SOFTWARE versión 1.5) y el módulo Relative Quant (basado en el método  $\Delta\Delta Ct$ ). Los datos se manejaron como se describió anteriormente (arriba, QPCR de ARN).
- 10 Tabla 9. Secuencias de cebadores y sondas (con conjugado fluorescente) utilizadas para determinaciones del número de copias de genes y detección de la estructura principal del plásmido de vector binario.

| Nombre        | SEQ ID NO: | Secuencia                 |
|---------------|------------|---------------------------|
| GAAD1-F       | 64         | TGTCGGTCCCTCTACCAA        |
| GAAD1-R       | 65         | CAACATCCATCACCTTGACTGA    |
| GAAD1-P (FAM) | 66         | CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA  |
| IVR1-F        | 67         | TGGCGGACGACGACTTGT        |
| IVR1-R        | 68         | AAAGTTGGAGGCTGCCGT        |
| IVR1-P (HEX)  | 69         | CGAGCAGACCGCCGTGACTTCTACC |
| SPC1A         | 70         | CTTAGCTGGATAACGCCAC       |
| SPC1S         | 71         | GACCGTAAGGCTTGATGAA       |
| TQSPEC (CY5*) | 72         | CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA     |

CY5 = Cianina-5

- 15 Tabla 10. Componentes de reacción para análisis del número de copias de genes y detección de la estructura principal del plásmido de vector binario.

| Componente               | Cantidad ( $\mu$ l) | Reserva    | Conc. Final |
|--------------------------|---------------------|------------|-------------|
| Tampón 2x                | 5.0                 | 2x         | 1x          |
| Cebador directo adecuado | 0.4                 | 10 $\mu$ M | 0.4         |
| Cebador inverso adecuado | 0.4                 | 10 $\mu$ M | 0.4         |
| Sonda apropiada          | 0.4                 | 5 $\mu$ M  | 0.2         |
| Cebador directo IVR1     | 0.4                 | 10 $\mu$ M | 0.4         |
| Cebador inverso IVR1     | 0.4                 | 10 $\mu$ M | 0.4         |
| Sonda IVR1               | 0.4                 | 5 $\mu$ M  | 0.2         |
| $H_2O$                   | 0.6                 | NA*        | NA          |
| ADNg                     | 2.0                 | ND**       | ND          |
| Total                    | 10.0                |            |             |

\*NA = No aplicable

\*\*ND = No determinado

Tabla 11. Condiciones del termociclador para qPCR de ADN.

| Análisis del número de copias genómicas. |              |        |            |
|--|--------------|--------|------------|
| Proceso                                  | Temperatura. | Tiempo | No. Ciclos |
| Activación de DIANA                      | 95 °C        | 10 min | 1          |
| Desnaturalizar                           | 95 °C        | 10 s   | 40         |
| Ampliar y adquirir FAM, HEX o CY5        | 60 °C        | 40 s   |            |
| Enfriar                                  | 40 °C        | 10 s   | 1          |

- 20 Ejemplo 8

#### Bioensayo de maíz transgénico

- 25 Bioensayos de insectos in vitro: La bioactividad del ARNdc producido en células vegetales se demuestra mediante métodos de bioensayo. Véase, por ejemplo, Baum et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-1326. Se puede demostrar eficacia, por ejemplo, al alimentar diversos tejidos vegetales o trozos de tejido derivados de una planta que produce un ARNdc insecticida para atacar insectos en un entorno de alimentación controlado. Alternativamente, se preparan extractos a partir de diversos tejidos vegetales derivados de una planta que produce el ARNdc insecticida y los ácidos nucleicos extraídos se dispensan encima de dietas artificiales para bioensayos como se describió anteriormente en el presente documento. Los resultados de dichos ensayos de alimentación se comparan con bioensayos realizados de manera similar que emplean tejidos de control apropiados de plantas huésped que no producen un ARNdc insecticida, o con otras muestras de control.

#### Bioensayos de insectos in vivo con eventos de maíz transgénico

Se seleccionan dos larvas del gusano de la raíz del maíz occidental (de 1 a 3 días de edad) eclosionados de huevos lavados y se colocan en cada pocillo de la bandeja de bioensayo. Luego, los pocillos se cubren con una tapa con lengüeta "PULL N' PEEL" (BIO-CV-16, BIO-SERV) y se colocan en una incubadora a 28 °C con un ciclo de 5 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 sobre el número total de insectos en cada tratamiento. Las muestras de insectos se congelan a -20 °C durante dos días, luego se reúnen y pesan las larvas de insectos de cada tratamiento. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calcula como el peso medio de los tratamientos experimentales dividido por la media del peso promedio de dos tratamientos de pozos de control. Los datos se expresan como Porcentaje de 10 Inhibición del Crecimiento (de los Controles Negativos). Los pesos medios que exceden el peso medio de control se normalizan a cero.

Bioensayos de insectos en invernadero: Los huevos del gusano occidental de la raíz del maíz (WCR, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) se recibieron en el suelo de CROP CHARACTERISTICS (Farmington, MN). Los huevos de WCR se incubaron a 28 °C durante 10 a 11 días. Los huevos se lavaron del suelo, se colocaron en una solución de agar al 0.15 % y la concentración se ajustó a aproximadamente 75 a 100 huevos por alícuota de 0.25 ml. Se instaló 15 una placa de eclosión en una placa de Petri con una alícuota de suspensión de huevos para monitorizar las tasas de eclosión.

20 El suelo alrededor de las plantas de maíz que crecen en ROOTRAINERS® estaba infestada con 150 a 200 huevos de WCR. Se permitió que los insectos se alimentaran durante 2 semanas, después de lo cual se le dio una "Clasificación de Raíces" a cada planta. Se utilizó una escala de lesión de ganglios para calificar esencialmente de acuerdo con Oleson et al. (2005) J. Econ. Entomol. 98(1):1-8. Las plantas que pasaron este bioensayo se trasplantaron a macetas de 18.9 litros para la producción de semillas. Los trasplantes fueron tratados con insecticida para evitar mayores daños 25 por gusanos de la raíz y la liberación de insectos en los invernaderos. Las plantas fueron polinizadas a mano para la producción de semillas. Las semillas producidas por estas plantas se guardaron para su evaluación en las generaciones T<sub>1</sub> y posteriores de plantas.

30 Los bioensayos en invernadero incluyeron dos tipos de plantas de control negativo. Se generaron plantas transgénicas de control negativo mediante transformación con vectores que albergan genes diseñados para producir una proteína fluorescente amarilla (YFP) o un ARNdc en horquilla de YFP (Véase Ejemplo 4). Se cultivaron plantas de control negativo no transformadas a partir de semillas de las estirpes 7sh382 o B104. Los bioensayos se realizaron en dos fechas distintas, con controles negativos incluidos en cada conjunto de materiales vegetales.

35 La Tabla 12 muestra los resultados combinados de análisis moleculares y bioensayos para plantas de horquilla de rnapl-140. El examen de los resultados del bioensayo resumidos en la Tabla 12 revela la sorprendente e inesperada observación de que la mayoría de las plantas de maíz transgénico que albergan constructos que expresan un ARNdc en horquilla de rnapl-140 que comprende segmentos de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, como se ejemplifica en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, están protegidos contra el daño a las raíces causado por la alimentación de las 40 larvas del gusano de la raíz del maíz occidental. Sólo seis de los 36 eventos calificados tuvieron una calificación raíz de 0.75 o mayor. La Tabla 13 muestra los resultados combinados de análisis moleculares y bioensayos para plantas de control negativo. La mayoría de las plantas no tenían protección contra la alimentación de las larvas de WCR, aunque cinco de las 34 plantas clasificadas tenían una calificación de raíces de 0.75 o menor. A veces se observa la presencia de algunas plantas que tienen puntuaciones bajas de raíces entre el conjunto de plantas de control negativo 45 y refleja la variabilidad y dificultad de realizar este tipo de bioensayo en un entorno de invernadero.

Tabla 12. Resultados de bioensayos de invernadero y análisis moleculares de plantas de maíz que expresan horquillas de rnapl-140.

| ID de muestra     | Tejido de hoja |              | Tejido de raíz |              | Calificación de raíz |
|-------------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------------|
|                   | ST-LS1 RTL*    | PER5 UTR RTL | ST-LS1 RTL*    | PER5 UTR RTL |                      |
| Eventos RNAPII v1 |                |              |                |              |                      |
| 114524[1]-001.001 | 0.089          | 72.5         | 0.023          | 95.0         | 0.1                  |
| 114524[1]-002.001 | 0.093          | 91.8         | 0.093          | 174.9        | 0.1                  |
| 114524[1]-004.001 | 0.179          | 110.7        | 0.245          | 105.4        | 0.01                 |
| 114524[1]-005.001 | 0.073          | 76.6         | 0.126          | 209.4        | 0.01                 |
| 114524[1]-007.001 | 0.103          | 62.2         | 0.147          | 73.0         | 0.05                 |
| 114524[1]-008.001 | 0.147          | 71.5         | 0.151          | 106.9        | 0.01                 |
| 114524[1]-009.001 | 0.240          | 157.6        | 0.151          | 213.8        | 0.25                 |
| 114524[1]-011.001 | 0.299          | 160.9        | 0.158          | 108.4        | 0.5                  |
| 114524[1]-012.001 | 0.361          | 176.1        | 0.127          | 227.5        | 0.25                 |
| 114524[1]-013.001 | 15.455         | 266.9        | 0.035          | 144.0        | 1                    |
| 114524[1]-015.001 | 0.737          | 205.1        | 0.064          | 206.5        | 0.25                 |
| 114524[1]-016.001 | 0.758          | 171.3        | 0.045          | 148.1        | 0.05                 |

# ES 2 959 628 T3

|                    |       |       |       |       |      |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|------|
| 114524[1]-017.001  | 0.435 | 458.3 | 0.066 | 203.7 | 0.01 |
| 114524 [1]-018.001 | 0.521 | 221.3 | 0.156 | 254.2 | 0.1  |
| 114524 [1]-022.001 | 0.330 | 224.4 | 0.166 | 151.2 | 0.01 |
| 114524 [1]-023.001 | 0.429 | 219.8 | 0.055 | 150.1 | 0.1  |
| 114524 [1]-024.001 | 0.683 | 261.4 | 0.901 | 369.6 | 0.1  |
| 114524 [1]-025.001 | 0.266 | 179.8 | 0.063 | 170.1 | 0.01 |
| 114524 [1]-027.001 | 0.106 | 45.9  | 0.026 | 33.6  | 1    |
| 114524 [1]-029.001 | 0.321 | 152.2 | 0.088 | 125.4 | 0.1  |
| 114524 [1]-030.001 | 0.248 | 112.2 | 0.060 | 192.7 | NG** |
| Eventos RNAPII v2  |       |       |       |       |      |
| 114525 [1]-001.001 | 0.132 | 97.0  | 0.019 | 50.6  | 0.1  |
| 114525 [1]-002.001 | 0.118 | 109.1 | 0.144 | 121.1 | 0.01 |
| 114525 [1]-006.001 | 0.257 | 150.1 | 0.107 | 229.1 | 0.05 |
| 114525 [1]-012.001 | 0.221 | 75.6  | 0.082 | 179.8 | 0.01 |
| 114525 [1]-014.001 | 0.090 | 44.3  | 0.060 | 70.0  | 0.01 |
| 114525 [1]-015.001 | 0.768 | 136.2 | 0.057 | 43.1  | 0.05 |
| 114525 [1]-016.001 | 0.096 | 54.2  | 0.209 | 93.1  | 0.75 |
| 114525[1]-017.001  | 0.376 | 65.3  | 0.268 | 61.0  | NG** |
| 114525 [1]-018.001 | 0.476 | 125.4 | 0.132 | 64.9  | NG** |
| 114525 [1]-019.001 | 0.134 | 0.1   | 0.000 | 1.7   | 1    |
| 114525 [1]-020.001 | 0.655 | 141.0 | 0.060 | 127.1 | 0.1  |
| 114525 [1]-021.001 | 0.683 | 176.1 | 1.670 | 227.5 | 1    |
| 114525 [1]-023.001 | 0.438 | 134.4 | 0.059 | 199.5 | 0.25 |
| 114525 [1]-025.001 | 0.785 | 171.3 | 0.145 | 150.1 | 0.01 |
| 114525 [1]-030.001 | 0.000 | 0.1   | 0.000 | 0.6   | 1    |
| 114525 [1]-032.001 | 0.737 | 202.3 | 0.143 | 69.6  | 0.05 |
| 114525 [1]-034.001 | 1.376 | 233.9 | 0.071 | 113.0 | 0.05 |
| 114525 [1]-035.001 | 0.611 | 118.6 | 0.067 | 111.4 | 0.05 |

\*RTL = Nivel de transcripto relativo medido frente a los niveles de transcripto del gen similar a TIP4.

\*\*NG = No clasificado debido al tamaño pequeño de la planta

Tabla 13. Resultados de bioensayos en invernadero y análisis molecular de plantas de control negativo que comprenden plantas de maíz transgénicas y no transformadas.

| ID de muestra            | Tejido de hoja |              | Tejido de raíz |              | Calificación de raíz |
|--------------------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------------|
|                          | ST-LS1 RTL*    | PER5 UTR RTL | ST-LS1 RTL*    | PER5 UTR RTL |                      |
| Eventos de proteína YFP  |                |              |                |              |                      |
| 101556 [679]-10513.001   | 0.000          | 0.0          | 0.000          | 32.7         | 1                    |
| 101556[679]-10514.001    | 0.173          | 171.3        | 0.240          | 202.3        | 1                    |
| 101556[679]-10515.001    | 0.000          | 42.5         | 0.000          | 45.6         | 1                    |
| 101556[679]-10516.001    | 0.000          | 18.9         | 0.000          | 65.3         | 0.75                 |
| 101556[677]-10524.001    | 0.000          | 315.2        | 0.000          | 364.6        | 1                    |
| 101556[677]-10525.001    | 0.000          | 184.8        | 0.000          | 95.0         | 1                    |
| 101556[677]-10526.001    | 0.000          | 0.2          | 0.000          | 0.3          | 1                    |
| 101556[677]-10527.001    | 0.000          | 170.1        | 0.000          | 128.0        | 1                    |
| 101556[677]-10528.001    | 0.000          | 179.8        | 0.067          | 104.0        | 1                    |
| 101556[677]-10529.001    | 0.000          | 98.4         | 0.000          | 38.9         | 1                    |
| Eventos de horquilla YFP |                |              |                |              |                      |
| 110853[8]-289.001        | 0.117          | 97.0         | 0.122          | 65.3         | 0.5                  |
| 110853[8]-290.001        | 0.098          | 70.0         | 0.272          | 79.3         | 1                    |
| 110853[8]-291.001        | 0.084          | 36.3         | 0.107          | 86.2         | 1                    |
| 110853[8]-293.001        | 0.088          | 79.9         | 0.624          | 101.1        | 0.05                 |
| 110853[8]-294.001        | 0.079          | 35.8         | 0.117          | 54.2         | 1                    |
| 110853[8]-295.001        | 0.095          | 82.7         | 0.114          | 145.0        | 1                    |
| 110853[8]-296.001        | 0.097          | 59.7         | 0.158          | 79.9         | 1                    |
| 110853[8]-297.001        | 0.106          | 0.1          | 0.000          | 2.5          | 1                    |
| 110853[8]-298.001        | 0.000          | 0.1          | 0.000          | 32.9         | 1                    |
| 110853[8]-299.001        | 0.354          | 143.0        | 0.308          | 101.8        | 1                    |
| 110853[8]-300.001        | 0.500          | 159.8        | 0.085          | 139.1        | 1                    |
| 110853[8]-301.001        | 0.304          | 174.9        | 1.007          | 111.4        | 1                    |
| Plantas no transformadas | 0.000          | 0.1          | 0.000          | 0.2          | 0.75                 |
| 7sh382                   | 0.000          | 0.1          | 0.000          | 0.1          | 1                    |
| 7sh382                   | 0.000          | 0.1          | 0.000          | 6.1          | NG**                 |

|        |       |     |       |       |      |
|--------|-------|-----|-------|-------|------|
| 7sh382 | 0.000 | 0.4 | 0.000 | 1.6   | 1    |
| 7sh382 | 0.287 | 0.0 | 0.000 | ND*** | 1    |
| 7sh382 | 0.000 | 0.2 | 0.000 | 0.3   | 0.75 |
| 7sh382 | 0.000 | 0.2 | 0.000 | 0.2   | 1    |
| B104   | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.6   | 1    |
| B104   | 0.000 | 0.1 | 0.000 | 0.3   | 1    |
| B104   | 0.000 | 0.4 | 1.000 | 1.0   | 1    |
| B104   | 0.000 | 0.1 | 0.000 | 0.5   | 1    |
| B104   | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 205.1 | 1    |
| B104   | 0.077 | 0.1 | 0.000 | 4.4   | 1    |

\*RTL = Nivel de transcripto relativo medido frente a los niveles de transcripto del gen similar a TIP4.

\*\*NG = No clasificado debido al tamaño pequeño de la planta

\*\*\* ND = No determinado

5 Ejemplo 9

Zea mays transgénico Que comprende secuencias de plagas de coleópteros

10 De diez a 20 plantas de Zea mays transgénicas T<sub>0</sub> se generan como se describe en el EJEMPLO 6. Se obtienen otras 10-20 estirpes independientes de Zea mays T<sub>1</sub> que expresan ARNi para la exposición al gusano de la raíz del maíz. El ARNi incluye SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o de otro modo comprenden además SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5. Los ARNi de horquilla adicionales se derivan de secuencias de plagas de coleópteros que incluyen Caf1-180 (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2012/0174258), Vatpasac (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2012/0174259), Rho1 (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2012/0174260), VatpasaH (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2012/0198586), PPI-87B (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2013/0091600), RPA70 (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2013/0091601), o RPS6 (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2013/0097730). Estos se confirman mediante RT-PCR u otros métodos de análisis molecular. Las preparaciones de ARN total de estirpes T<sub>1</sub> independientes seleccionadas en las que el ARNi contiene un intrón ST-LS1 se utilizan para RT-PCR con cebadores diseñados para unirse al intrón ST-LS1. Además, se utilizan 15 cebadores específicos para cada gen diana en una construcción de ARNi para amplificar y confirmar la producción del ARNm preprocesado necesario para la producción de ARNip en planta, cuando corresponda. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen diana confirma la expresión del ARNi en cada planta de Zea mays transgénica. El procesamiento del ARNi en ARNip se confirma posteriormente en estirpes transgénicas independientes mediante 20 hibridaciones por transferencia de ARN.

25 Las moléculas de ARNi que tienen secuencias con emparejamiento erróneo con más del 80 % de identidad de secuencia con los genes diana afectan a los gusanos de la raíz del maíz de una manera similar a la que se observa con las moléculas de ARNi que tienen una identidad de secuencia del 100 % con los genes diana. El emparejamiento de secuencias con emparejamiento erróneo con secuencias nativas para formar ARNdc suministrar ARNip procesado 30 por plantas que afecta el crecimiento, desarrollo y viabilidad de las plagas de coleópteros que se alimentan.

35 El suministro en planta de ARNdc, ARNip o ARNmi correspondientes a genes diana y la posterior absorción por las plagas de coleópteros a través de la alimentación da como resultado una regulación a la baja de los genes diana en la plaga de coleópteros mediante el silenciamiento génico mediado por ARN. Cuando la función de un gen diana es importante en uno o más estadios de desarrollo, el crecimiento, desarrollo y reproducción de la plaga de coleópteros se ve afectado, y en el caso de al menos uno de WCR, NCR, SCR, MCR, D. balteata LeConte, D.u. tenella, y D.u. undecimpunctata Mannerheim, provoca que la plaga de coleópteros no pueda infestarse, alimentarse, desarrollarse y/o reproducirse con éxito, o provoca la muerte de la plaga de coleópteros. La elección de los genes diana y la aplicación exitosa de ARNi se utilizan luego para controlar plagas de coleópteros.

40 Comparación fenotípica de estirpes de ARNi transgénicas y Zea mays no transformado

45 Los genes o secuencias de plagas de coleópteros diana seleccionadas para crear ARNi no tienen similitud sustancial con ninguna otra secuencia de genes de plantas conocida. Por lo tanto, la producción o activación de ARNi (sistémico) mediante construcciones dirigidas a estos genes o secuencias de plagas de coleópteros no tiene ningún efecto perjudicial sobre las plantas transgénicas. Se comparan el desarrollo y las características morfológicas de las estirpes transgénicas con plantas no transformadas, así como con las de estirpes transgénicas transformadas con un vector "vacío" que no tiene ningún gen que exprese la horquilla. Se comparan las características de raíz, brote, follaje y reproducción de las plantas. No hay diferencias observables en la longitud de las raíces y los patrones de crecimiento 50 de las plantas transgénicas y no transformadas. Las características de los brotes de las plantas, como la altura, el número y tamaño de las hojas, el momento de la floración, el tamaño de la flor y la apariencia, son similares. En general, no existen diferencias morfológicas observables entre estirpes transgénicas y aquellas sin expresión de moléculas de ARNi diana cuando se cultivan in vitro y en el suelo del invernadero.

55 Ejemplo 10

Zea mays transgénico que comprende una secuencia de plagas de coleópteros y construcciones de ARNi adicionales

5 Una planta de Zea mays transgénica que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe para producir una molécula de ARNi que se dirige a un organismo distinto de una plaga de coleópteros y se transforma secundariamente a través de Agrobacterium o metodologías de WHISKERS™ (véase Petolino and Arnold (2009) *Métodos Mol. Biol.* 526:59-67) para producir una o más moléculas de ARNi insecticidas (por ejemplo, al menos una molécula de ARNdc que incluye una molécula de ARNdc dirigida a un gen que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5). Se suministran vectores plasmídicos de transformación de plantas preparados esencialmente como se describe en el EJEMPLO 4 a través de métodos de transformación mediada por Agrobacterium o WHISKERS™ en células en suspensión de maíz o embriones de maíz inmaduros obtenidos de una planta de Zea mays Hi II o B104 transgénica que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe para producir una molécula de ARNi que se dirige a un organismo distinto de una plaga de coleópteros. Los embriones transformados resultantes se utilizan para regenerar plantas enteras que han demostrado tener resistencia a una plaga de coleópteros y a organismos distintos de una plaga de coleópteros.

10

15

#### Ejemplo 11

20 Zea mays transgénico que comprende una construcción de ARNi y secuencias adicionales de control de plagas de coleópteros

25 Una planta de Zea mays transgénica que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe para producir una molécula de ARNi que se dirige a un organismo de plaga de coleópteros (por ejemplo, al menos una molécula de ARNdc que incluye una molécula de ARNdc que se dirige a un gen que comprende la SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5) se transforma secundariamente a través de Agrobacterium o metodologías WHISKERS™ para producir una o más moléculas de proteína insecticida, por ejemplo, proteínas insecticidas Cry 3, Cry34 y Cry 35. Se suministran vectores plasmídicos de transformación de plantas preparados esencialmente como se describe en el EJEMPLO 4 a través de métodos de transformación mediada por Agrobacterium o WHISKERS™ en células en suspensión de maíz o embriones de maíz inmaduros obtenidos de una planta de Zea mays transgénica B104 que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe para producir una molécula de ARNi que se dirige a un organismo plaga de coleópteros. Se obtienen plantas doblemente transformadas que producen moléculas de ARNi y proteínas insecticidas para el control de plagas de coleópteros.

30

35

#### Ejemplo 12

35 Transcriptoma del escarabajo del polen

40 Insectos: Se recolectaron larvas y escarabajos del polen adultos de campos con plantas de colza en flor (Giessen, Alemania). Se inocularon escarabajos adultos jóvenes (cada uno por grupo de tratamiento: n = 20; 3 réplicas) al inyectar una mezcla de dos bacterias diferentes (*Escherichia coli* aureus y *Pseudomonas aeruginosa*), una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y LPS bacteriano. Los cultivos bacterianos se cultivaron a 37 °C con agitación y la densidad óptica se monitorizó a 600 nm (OD600). Las células se recogieron a una OD600 ~1 mediante centrifugación y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato. La mezcla se introdujo ventrolateralmente al pinchar el abdomen de imagos del escarabajo del polen utilizando una aguja de disección sumergida en una solución acuosa de 10 mg/ml de LPS (endotoxina de *E. coli* purificada; Sigma, Taufkirchen, Alemania) y los cultivos de bacterias y levaduras. Junto con los escarabajos inmunes, se recolectaron escarabajos y larvas no tratados (n = 20 por y 3 réplicas cada uno) en el mismo momento.

45

50 Aislamiento de ARN: El ARN total se extrajo 8 h después de la inmunización de escarabajos y larvas congelados utilizando TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, EE. UU.) y se purificó utilizando el Kit RNeasy Micro (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo en cada caso las orientaciones de los fabricantes. La integridad del ARN se verificó utilizando un Bioanalizador Agilent 2100 y un Nanokit RNA 6000 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.). La cantidad de ARN se determinó utilizando un espectrofotómetro NANODROP® ND-1000. Se extrajo ARN de cada uno de los grupos de tratamiento inmunitario de adultos, grupos de control de adultos y grupos de larvas individualmente y posteriormente se combinaron cantidades iguales de ARN total en un conjunto por muestra (adultos inmunes inoculados, adultos de control y larvas) para la secuenciación.

55

60 Información del transcriptoma: Generación y ensamble de datos de RNA-Seq. Se llevó a cabo una lectura única de RNA-Seq de 100 pb por separado en 5 µg de ARN total aislado de escarabajos adultos inmunoinoculados, escarabajos adultos sin tratamiento previo (control) y larvas no tratadas. La secuenciación fue realizada por Eurofins MWG Operon utilizando la plataforma Illumina HiSeq-2000. Esto produjo 20.8 millones de lecturas para la muestra de escarabajos adultos de control, 21.5 millones de lecturas para la muestra de escarabajos adultos inoculados con LPS y 25.1 millones de lecturas para la muestra de larvas. Las lecturas agrupadas (67.5 millones) se ensamblaron utilizando el software ensamblador Velvet/Oases (M.H. Schulz et al. (2012) *Bioinformatics*. 28:1086-92; Zerbino & E. Birney (2008) *Genome Research*. 18:821-9). El transcriptoma contenía 55648 secuencias.

65

Identificación de RNAPII del escarabajo del polen: Se utilizó una búsqueda tBLASTn del transcriptoma para identificar cónigos coincidentes. Como consulta, se utilizó la secuencia de péptidos de la subunidad RPB2 de la polimerasa de ARN II dirigida por ADN de *Tribolium castaneum* (GENBANK® XP\_974653.1). Se identificaron nueve cónigos (RGK\_contig35101, RGK\_contig15220, RGK\_contig54586, RGK\_contig33671, RGK\_contig54748, RGK\_contig50449, RGK\_contig26724, RGK\_contig40010, RGK\_contig14232). Los espacios entre los cónigos se

5 completaron con lecturas sin ensamblar utilizando una herramienta interna. Se utilizó GAP5 (Bonfield JK & Whitwam (2010). *Bioinformatics* 26: 1699-1703 para la verificación de secuencias.

10 Ejemplo 13

10 Mortalidad del escarabajo de polen (*Meligethes aeneus*) después del tratamiento con rnapII ARN*i*

15 Se utilizaron cebadores específicos de genes que incluyen la secuencia promotora de la polimerasa T7 en el extremo 5' para crear productos de PCR de aproximadamente 500 pb mediante PCR (SEQ ID NO: 78 y 79). Los fragmentos de PCR se clonaron en el vector pGEM T easy de acuerdo con el protocolo del fabricante y se enviaron a una empresa de secuenciación para verificar la secuencia. Luego, el ARNdc fue producido por la polimerasa de ARN T7 (MEGAscript® ARN*i* Kit, Applied Biosystems) a partir de una construcción de PCR generada a partir del plásmido secuenciado según el protocolo del fabricante.

20 20 La inyección de ~100 nl de ARNdc (1 ug/ul) (SEQ ID NO: 77) en larvas y escarabajos adultos (n=10; 3 repeticiones biológicas) se realizó con un micromanipulador bajo un estereomicroscopio de disección. Los animales fueron anestesiados en hielo antes de fijarlos a cinta adhesiva doble. Los controles recibieron el mismo volumen de agua. Se realizó un control negativo de ARNdc de IMPI (gen inhibidor de metaloproteininas de insectos del lepidóptero *Galleria mellonella*). No se pudieron probar todos los controles en todas las etapas debido a la falta de animales.

25 25 Los escarabajos del polen se mantuvieron en placas de Petri con polen seco y un pañuelo húmedo. Las larvas se criaron en cajas de plástico sobre inflorescencias de canola en un medio de agaragua.

30 Tabla 14. Resultados del bioensayo de inyección de escarabajos de polen adultos.

| Tratamiento | % de Media de Supervivencia ± DE* |         |         |         |        |
|-------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|--------|
|             | Día 0                             | Día 2   | Día 4   | Día 6   | Día 8  |
| rnapII      | 100 ± 0                           | 100 ± 0 | 97 ± 6  | 93 ± 6  | 90 ± 0 |
| agua        | 100 ± 0                           | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 97 ± 6 |
|             | Día 10                            | Día 12  | Día 14  | Día 16  |        |
| rnapII      | 87 ± 6                            | 83 ± 12 | 73 ± 29 | 73 ± 29 |        |
| agua        | 90 ± 10                           | 90 ± 10 | 90 ± 10 | 90 ± 10 |        |

\* Desviación Estándar

35 Tabla 15. Resultados del bioensayo de inyección de larvas de escarabajo del polen.

| Tratamiento      | % de Media de Supervivencia ± DE* |         |         |         |
|------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|
|                  | Día 0                             | Día 2   | Día 4   | Día 6   |
| rnapII           | 100 ± 0                           | 70 ± 10 | 13 ± 12 | 10 ± 10 |
| Control negativo | 100 ± 0                           | 100 ± 0 | 97 ± 6  | 73 ± 21 |

\* Desviación Estándar

35 35 Los controles se realizaron en otra fecha debido a la limitada disponibilidad de insectos.

40 Ensayo de alimentación: Los escarabajos se mantuvieron sin acceso al agua en tubos Falcon vacíos 24 h antes del tratamiento. Se colocó una gota de ARNdc (~5 µl) en una pequeña placa de Petri y se agregaron de 5 a 8 escarabajos a la placa de Petri. Los animales se observaron bajo un microscopio estereoscópico y se seleccionaron para el bioensayo aquellos que ingirieron una solución dietética que contenía ARNdc. Los escarabajos se transfirieron a placas de Petri con polen seco y un pañuelo húmedo. Los controles recibieron el mismo volumen de agua. Se llevó a cabo un ARNdc de control negativo de IMPI (gen inhibidor de metaloproteinasa de insectos del lepidóptero *Galleria mellonella*). No se pudieron probar todos los controles en todas las etapas debido a la falta de animales.

45 45 Tabla 16. Resultados del bioensayo de alimentación de adultos.

| Tratamiento      | % de Media de Supervivencia ± DE* |          |         |          |          |
|------------------|-----------------------------------|----------|---------|----------|----------|
|                  | Día 0                             | Día 2    | Día 4   | Día 6    | Día 8    |
| rnapII           | 100 ± 0                           | 97 ± 6   | 90 ± 10 | 87 ± 6   | 87 ± 6   |
| Control negativo | 100 ± 0                           | 93 ± 5.8 | 90 ± 10 | 87 ± 5.8 | 83 ± 5.8 |
| agua             | 100 ± 0                           | 100 ± 0  | 100 ± 0 | 93 ± 3.8 | 93 ± 3.8 |
|                  | Día 10                            | Día 12   | Día 14  | Día 16   |          |

|                  |          |         |         |         |
|------------------|----------|---------|---------|---------|
| rnapiI           | 80 ± 10  | 70 ± 10 | 67 ± 15 | 60 ± 10 |
| Control negativo | 80 ± 10  | 80 ± 10 | 80 ± 10 | 77 ± 12 |
| agua             | 93 ± 3.8 | 87 ± 10 | 80 ± 13 | 80 ± 13 |

\* Desviación Estándar

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

5 Ejemplo 14

Transformación mediada por Agrobacterium de hipocótilos de canola (*Brassica napus*)

10 Preparación de Agrobacterium

15 La cepa de Agrobacterium que contiene un plásmido binario se siembra en medio YEP (Bacto Peptone™ 20.0 g/l y extracto de levadura 10.0 g/l) que contiene estreptomicina (100 mg/ml) y espectinomicina (50 mg/ml) y se incuba durante 2 días a 28 °C. La cepa de Agrobacterium propagada que contiene el plásmido binario se raspa de la placa de siembra de 2 días utilizando un bucle de inoculación estéril. Luego se inocula la cepa de Agrobacterium raspada que contiene el plásmido binario en 150 ml de líquido YEP modificado con estreptomicina (100 mg/ml) y espectinomicina (50 mg/ml) en matraces estériles con deflectores de 500 ml y se agita a 200 rpm a 28 °C. Los cultivos se centrifugan y se resuspenden en medio M (sales LS, glucosa al 3 %, vitaminas B5 modificadas, cinetina 1 µM, 2,4-D 1 µM, pH 5.8) y se diluyen hasta la densidad apropiada (50 unidades Klett medida utilizando un espectrofotómetro) antes de la transformación de los hipocótilos de canola.

20

Transformación de canola

25 Germinación de la semilla: Se esterilizan semillas de canola (var. NEXERA 710™) en superficie en Clorox™ al 10 % durante 10 minutos y se enjuaga tres veces con agua destilada esterilizada (las semillas se contienen en coladores de acero durante este proceso). Las semillas se plantan para su germinación en ½ medio MS Canola (1/2 MS, sacarosa al 2 %, agar al 0.8 %) contenido en Phytatrays™ (25 semillas por Phytatray™) y colocan en una cámara de crecimiento Percival™ con régimen de crecimiento establecido a 25 °C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 5 días de germinación.

30

35 Pretratamiento: El día 5, se extirpan asépticamente segmentos de hipocótilo de aproximadamente 3 mm de longitud, y se descartan las secciones restantes de raíz y brote (se evita el secado de los segmentos de hipocótilo al sumergir los segmentos de hipocótilo en 10 ml de agua milliQ™ estéril durante el proceso de escisión). Los segmentos de hipocótilo se colocan horizontalmente sobre papel de filtro estéril sobre medio de inducción de callos, MSK1D1 (MS, 1 mg/l de cinetina, 1 mg/l de 2,4-D, sacarosa al 3.0 %, fitagar al 0.7 %) durante 3 días de pretratamiento en una cámara de crecimiento Percival™ con régimen de crecimiento establecido a 22-23 °C, y fotoperiodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad.

40

45 Cocultivo con Agrobacterium: El día antes del cocultivo con Agrobacterium, se inoculan matraces de medio YEP que contienen los antibióticos apropiados con la cepa de Agrobacterium que contiene el plásmido binario. Los segmentos de hipocótilo se transfieren del medio de inducción de callos de papel de filtro, MSK1D1, a una placa de Petri™ vacío de 100 x 25 mm que contiene 10 ml de medio M líquido para evitar que los segmentos de hipocótilo se sequen. En este estadio se utiliza una espátula para sacar los segmentos y transferirlos a un medio nuevo. El medio M líquido se retira con una pipeta y se agregan 40 ml de suspensión de Agrobacterium a la placa de Petri™ (500 segmentos con 40 ml de solución de Agrobacterium). Los segmentos de hipocótilo se tratan durante 30 minutos con agitación periódica de la placa de Petri™ para que los segmentos del hipocótilo permanezcan sumergidos en el solución de Agrobacterium. Al final del período de tratamiento, la solución de Agrobacterium se pipetea en un vaso de precipitados desechable; esterilizado en autoclave y desecharlo (la solución de Agrobacterium se elimina por completo para evitar el crecimiento excesivo Agrobacterium). Los hipocótilos tratados se transfieren con pinzas a las placas originales que contienen medio MSK1D1 cubierto con papel de filtro (se tiene cuidado de garantizar que los segmentos no se sequen).

50

55 Los segmentos de hipocótilo transformados y los segmentos de hipocótilo de control no transformados se devuelven a la cámara de crecimiento Percival™ bajo intensidad de luz reducida (cubriendo las placas con papel de aluminio), y los segmentos de hipocótilo tratados se cocultivan con Agrobacterium durante 3 días.

60

Inducción de callo en medio de selección: Despues de 3 días de cocultivo, los segmentos de hipocótilo se transfieren individualmente con fórceps a un medio de inducción de callo, MSK1D1H1 (MS, 1 mg/l de cinetina, 1 mg/l de 2,4-D, 0.5 g/l de MES, 5 mg/l de AgNO<sub>3</sub>, 300 mg/l de Timentin™, 200 mg/l de carbenicilina, 1 mg/l de Herbiace™, sacarosa al 3 %, fitagar al 0.7 %) con un régimen de crecimiento establecido en 22-26 °C. Los segmentos de hipocótilo están anclados en el medio pero no están profundamente incrustados en él.

65

Selección y regeneración de brotes: Despues de 7 días en medio de inducción de callos, los segmentos de hipocótilo callosos se transfieren al Medio de Regeneración de Brotes 1 con selección, MSB3Z1H1 (MS, 3 mg/l de BAP, 1 mg/l de zeatina, 0.5 g/l de MES, 5 mg/l de AgNO<sub>3</sub>, 300 mg/l de Timentin™, 200 mg/l de carbenicilina, 1 mg/l de Herbiace™, sacarosa al 3 %, fitagar al 0.7 %). Despues de 14 días, los segmentos de hipocótilo que desarrollan brotes se

transfieren al Medio de Regeneración 2 con selección aumentada, MSB3Z1H3 (MS, 3 mg/l de BAP, 1 mg/l de Zeatin, 0.5 g/l de MES, 5 mg/l de AgNO<sub>3</sub>, 300 mg/l de Timentin™, 200 mg/l de carbenicilina, 3 mg/l de Herbiace™, sacarosa al 3 %, fitagar al 0.7 %) con un régimen de crecimiento establecido a 22-26 °C.

- 5 Elongación del brote: Despues de 14 días, los segmentos de hipocótilo que desarrollan brotes se transfieren del Medio de Regeneración 2 al medio de elongación de brotes, MSMESH5 (MS, 300 mg/l de Timentin™, 5 mg/l de Herbiace™, sacarosa al 2 %, TC Agar al 0.7 %) con un régimen de crecimiento establecido entre 22 y 26 °C. Se aislaron brotes que ya estaban alargados de los segmentos de hipocótilo y se transfirieron a MSMESH5. Despues de 14 días, los brotes restantes que no se han alargado en la primera ronda de cultivo en un medio de elongación de brotes se transfieren a un medio de elongación de brotes fresco, MSMESH5. En este estadio se descartan todos los segmentos de hipocótilo restantes que no producen brotes.

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

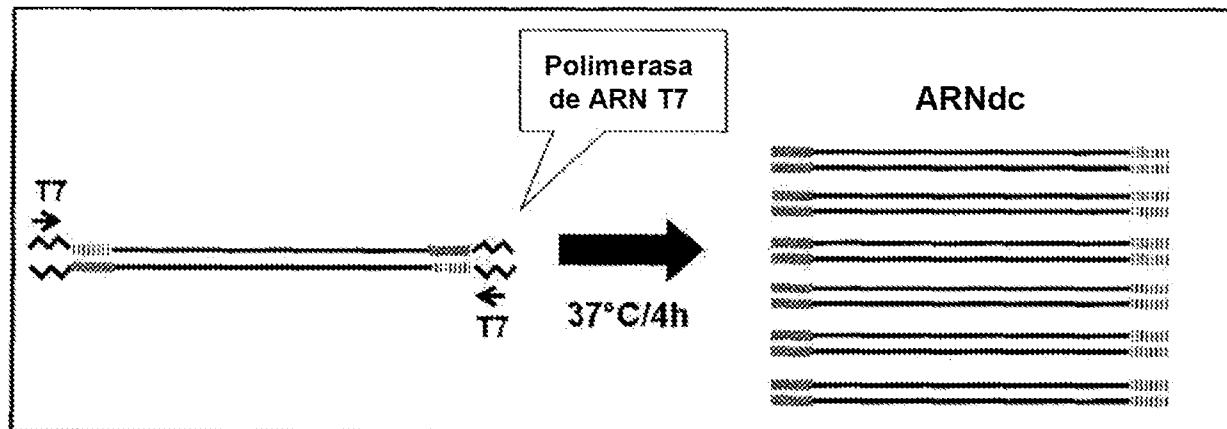
15 Análisis por PCR: Los segmentos de hipocótilo de canola transformados que se regeneraron en brotes que comprenden raíces se analizan adicionalmente mediante un ensayo de confirmación molecular por PCR. El tejido de la hoja se obtiene de los brotes verdes y se prueba mediante PCR para detectar la presencia del gen marcador seleccionable pat. Cualquier brote clorótico se descarta y no se somete a análisis de PCR. Las muestras que se identifiquen como positivas para la presencia del gen marcador seleccionable pat se mantiene y se cultiva en medio MSMEST para continuar el desarrollo y el alargamiento de los brotes y las raíces. Se descartan las muestras que se identifiquen que no contienen el gen marcador seleccionable pat negativo de acuerdo con el análisis por PCR.

20 25 Las plantas de canola transformadas que comprenden brotes y raíces que son positivas por PCR para la presencia del gen marcador seleccionable pat se trasplanta al suelo en un invernadero. Despues del establecimiento de las plantas de canola en el suelo, las plantas de canola se analizan más a fondo para cuantificar el número de copias del casete de expresión génica pat a través de un ensayo de PCR cuantitativa Invader™ y transferencia Southern. Las plantas de canola transgénicas T<sub>0</sub> que se confirmaron por contener al menos una copia del casete de expresión génica pat se hacen avanzar para un análisis más detallado de la semilla. Las semillas obtenidas de estas plantas de canola transgénicas T<sub>0</sub>, es decir, semillas de canola T<sub>1</sub>, se analizan para detectar la presencia del gen diana.

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido operativamente ligado a un promotor que es funcional en una célula vegetal, en la que el polinucleótido codifica una molécula de ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) que inhibe la expresión de un gen endógeno en un gusano de la raíz del maíz occidental (WCR) cuando la molécula de ARNdc es ingerida por el WCR y, en la que la ingestión de la molécula de ARNdc por el WCR da como resultado la muerte o cese del crecimiento, desarrollo, reproducción, y/o alimentación en el WCR, en la que el polinucleótido comprende al menos una primera secuencia de nucleótidos que es 100 % idéntica a al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 4, el complemento de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, o el complemento de la SEQ ID NO: 5.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la primera secuencia de nucleótidos es la SEQ ID NO: 4, el complemento de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, o el complemento de la SEQ ID NO: 5.
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la molécula de ARNdc es una molécula de ARN en horquilla (ARNhn), el polinucleótido que comprende además una segunda secuencia de nucleótidos y una tercera secuencia de nucleótidos, en la que la primera secuencia de nucleótidos codifica un primer polirribonucleótido en la molécula de ARNhn, en la que la segunda secuencia de nucleótidos separa la primera y tercera secuencias de nucleótidos en el polinucleótido, la segunda secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polirribonucleótido en la molécula de ARNhn, y en la que la tercera secuencia de nucleótidos codifica un tercer polirribonucleótido en la molécula de ARNhn, y en la que el tercer polirribonucleótido hibridoado al primer polirribonucleótido en una estructura de tallo en la molécula de ARNhn.
4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, en la que la molécula es un vector de transformación de planta.
5. Una molécula de ARN en horquilla (ARNhn) que inhibe la expresión de un gen endógeno en un gusano de la raíz del maíz occidental (WCR) cuando la molécula de ARNhn es ingerida por el WCR, y, en la que la ingestión de la molécula de ARNhn por el WCR da como resultado la muerte o cese del crecimiento, desarrollo, reproducción, y/o alimentación en el WCR, la molécula de ARNhn que comprende, en la dirección 5' a 3': un primer polirribonucleótido que está codificado por una primera secuencia de nucleótidos que es 100 % idéntica a al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 4, el complemento de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, o el complemento de la SEQ ID NO: 5;
6. un segundo polirribonucleótido; y
7. un tercer polirribonucleótido,
- en el que la molécula de ARNhn comprende:
- una estructura de tallo que comprende el primer polirribonucleótido hibridoado al tercer polirribonucleótido, y una estructura de bucle que comprende el segundo polirribonucleótido.
6. Una célula vegetal transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, en la que el promotor ligado operativamente al polinucleótido es funcional en la célula vegetal, y en la que la molécula es una molécula de ácido nucleico genómica.
7. La célula vegetal de la reivindicación 6, en la que la célula vegetal es de *Zea mays*.
8. Una planta transgénica resistente al gusano de la raíz del maíz occidental (WCR) que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, en la que el promotor ligado operativamente al polinucleótido es funcional en la planta, y en la que la molécula es una molécula de ácido nucleico genómica.
9. La planta transgénica resistente a WCR de la reivindicación 8, en la que la planta es *Zea mays*.
10. Un método para controlar una población de gusanos de la raíz del maíz occidental (WCR), el método que comprende alimentar a los insectos WCR de la población con la molécula de ARNhn de la reivindicación 5, inhibiendo de esta manera la expresión de un gen endógeno en un insecto WCR cuando la molécula de ARNhn es ingerida por el insecto WCR.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en la que alimentar a los insectos WCR de la población con la molécula de ARNhn comprende:
- alimentar a los insectos WCR de la población con un material vegetal transgénico que expresa la molécula de ARNhn;
- o
- aplicar una composición que comprende la molécula de ARNhn a una planta infestada por los insectos WCR de la población.

**Figura 1.** Generación de ARNdc a partir de una plantilla de transcripción única.



**Figura 2.** Generación de ARNdc a partir de dos plantillas

