

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 279**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2015 E 15202058 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3037432**

54 Título: **Moléculas de ácido nucleico de Nucampholin para controlar plagas de insectos coleópteros**

30 Prioridad:

22.12.2014 US 201462095487 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NARVA, KENNETH E.;
WORDEN, SARAH E.;
FREY, MEGAN L.;
GENG, CHAOXIAN;
RANGASAMY, MURUGESAN;
ARORA, KANIKA;
VEERAMANI, BALAJI;
GANDRA, PREMCHAND;
VILCINSKAS, ANDREAS y
KNORR, EILEEN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 811 279 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 de Nucampholin para controlar plagas de insectos coleópteros

5 Campo técnico de la descripción

La presente invención se refiere generalmente al control genético del daño a las plantas causado por plagas de insectos (*por ejemplo*, plagas de coleópteros). La presente invención se refiere a polinucleótidos codificantes y no codificantes objetivo, y al uso de tecnologías de ARNi para la represión o inhibición postranscripcional de la expresión de polinucleótidos codificantes y no codificantes en las células de una plaga de insectos para proporcionar un efecto protector a la planta.

Antecedentes

15 El gusano de la raíz del maíz occidental (WCR, por sus siglas en inglés), *Diabrotica 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 de cultivo de maíz del medio oeste de los Estados Unidos. El gusano de la raíz del maíz del norte (NCR, por sus siglas en inglés), *Diabrotica barberi* Smith y Lawrence, es una especie estrechamente relacionada que convive en gran parte del mismo intervalo que WCR. Hay otras varias subespecies relacionadas de *Diabrotica* que son plagas importantes en América del Norte: el gusano de la raíz del maíz mexicano (MCR, por sus siglas en inglés), *D. virgifera zea* Krysan y Smith; el gusano de la raíz del maíz del sur (SCR, por sus siglas en inglés), *D. undecimpunctata howardi* Barber; *D. balteata* LeConte; *D. undecimpunctata tenella*; *D. speciosa* Germar; y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos ha estimado que los gusanos de la raíz del maíz causan \$ 1 billón en pérdidas de ingreso cada año, incluidos \$ 800 millones en pérdida de rendimiento y \$ 200 millones en costos de tratamiento.

Tanto WCR como NCR se depositan en el suelo como huevos durante el verano. Los insectos permanecen en la etapa de huevo por todo el invierno. Los huevos son alargados, blancos y de menos de 0,004 pulgadas de longitud. Las larvas eclosionan a fines 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 ubicación. Las larvas recién eclosionadas son gusanos blancos que tienen menos de 0,125 pulgadas de longitud. Una vez eclosionadas, las larvas comienzan a alimentarse de raíces de maíz. Los gusanos de la raíz del maíz pasan a través de tres estadios larvarios. Después de alimentarse durante varias semanas, las larvas mudan a la etapa pupal. Pupan en el suelo, y luego emergen del suelo como adultos en julio y agosto. Los gusanos de la raíz adultos tienen alrededor de 0,25 pulgadas de longitud.

Las larvas del gusano de la raíz del maíz completan el desarrollo en el maíz y otras varias especies de pastos. Las larvas criadas en cola de zorro amarilla emergen más tarde y tienen un tamaño de cápsula de cabeza más pequeño en la edad adulta que las larvas criadas en maíz. Ellsbury y otros (2005) Environ. Entomol. 34:627-34. Los WCR adultos se alimentan de la seda, polen y granos del maíz expuestos en las puntas de las mazorcas. Si los WCR adultos emergen antes de que estén presentes los tejidos reproductivos del maíz, pueden alimentarse del tejido de la hoja, de esta manera ralentiza el crecimiento de la planta y ocasionalmente mata a la planta huésped. Sin embargo, los adultos cambiarán rápidamente a las sedas y polen preferidos cuando estén disponibles. Los adultos de NCR también se alimentan de tejidos reproductivos de la planta de maíz, pero por el contrario raramente se alimentan de hojas de maíz.

45 La mayor parte del daño del gusano de la raíz en el maíz es causada por la alimentación larval. Los gusanos de la raíz recién eclosionados se alimentan inicialmente de los finos pelos de la raíz 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 son abundantes, la alimentación larval a menudo resulta en la poda de las raíces hasta la base del tallo del maíz. La lesión severa de la raíz interfiere con la capacidad de las raíces para transportar agua y nutrientes a la planta, reduce el crecimiento de la planta y resulta en una producción reducida de granos, de esta manera, a menudo se reduce drásticamente el rendimiento general. La lesión severa de la raíz también a menudo resulta en el alojamiento de plantas de maíz, lo que dificulta la cosecha y disminuye más el rendimiento. Además, la alimentación por los adultos de los tejidos reproductivos del maíz puede resultar en la poda de sedas en la punta de la mazorca. Si este "recorte de seda" es lo suficientemente severo durante el desprendimiento del polen, la polinización puede interrumpirse.

55 El control de los gusanos de la raíz del maíz puede intentarse mediante rotación de cultivos, insecticidas químicos, biopesticidas (*por ejemplo*, la bacteria grampositiva formadora de esporas, *Bacillus thuringiensis*), o una combinación de estos. La rotación de cultivos tiene la desventaja significativa de imponer restricciones no deseadas sobre el uso de tierras de cultivo. Además, la oviposición de algunas especies de gusanos de la raíz puede ocurrir en los campos de soya, lo que mitiga, de esta manera, la efectividad de la rotación de cultivos practicada con maíz y soya.

65 Los insecticidas químicos son la estrategia más fuertemente confiada para lograr el control del gusano de la raíz del maíz. Se cree que el uso de insecticidas químicos es una estrategia imperfecta de control del gusano de la raíz del maíz; más de \$ 1 billón puede perderse en los Estados Unidos cada año debido al gusano de la raíz del maíz cuando los costos de los insecticidas químicos se añaden a los costos del daño del gusano de la raíz que puede ocurrir a pesar del uso de los insecticidas. Las altas poblaciones de larvas, las fuertes lluvias y la aplicación inadecuada de los insecticidas pueden

resultar todos en un control del gusano de la raíz del maíz inadecuado. Además, el uso continuo de insecticidas puede seleccionar cepas de gusanos de la raíz resistentes a los insecticidas, así como también plantea preocupaciones ambientales significativas debido a la toxicidad de muchos de ellos para especies no objetivo.

5 Los escarabajos del polen europeos (PB, por sus siglas en inglés) son plagas graves en la colza oleaginosa, tanto las larvas como los adultos se alimentan de flores y polen. El daño del escarabajo del polen al cultivo puede causar una pérdida de rendimiento del 20-40 %. La principal especie de plaga es *Meligethes aeneus* Fabricius. Actualmente, el control del escarabajo del polen en la colza oleaginosa se basa principalmente en piretroides que se espera que sean eliminados pronto debido a su perfil ambiental y regulatorio. Además, se ha informado de la resistencia del escarabajo del polen a los insecticidas químicos existentes. Por lo tanto, se necesitan con urgencia soluciones de control del escarabajo del polen amigables con el ambiente con nuevos modos de acción.

15 En la naturaleza, los escarabajos del polen pasan el invierno como adultos en el suelo o debajo de la hojarasca. En primavera, los adultos salen de la hibernación y comienzan a alimentarse de flores de malezas y migran a plantas de colza oleaginosa florecidas. Los huevos se ponen en los capullos de colza oleaginosa. Las larvas se alimentan y se desarrollan en los capullos y las flores. Las larvas de etapa tardía encuentran un sitio de pupación en el suelo. Los adultos de segunda generación emergen en julio y agosto y se alimentan de varias plantas florecidas antes de encontrar sitios para pasar el invierno.

20 La interferencia de ARN (ARNi) es un proceso que utiliza trayectorias celulares endógenas, de manera que una molécula de ARN interferente (iARN) (*por ejemplo*, una molécula de ARNs) que es específica para todo, o cualquier porción de tamaño adecuado, de un gen objetivo resulta en la degradación del ARNm codificado de esta manera. En los últimos años, el ARNi se ha usado para realizar la "eliminación" de genes en una serie de especies y sistemas experimentales; por ejemplo, plantas *Caenorhabditis elegans*, embriones de insectos y células en cultivo de tejidos. Véase, *por ejemplo*, Fire y otros (1998) Nature 391:806-11; Martínez y otros (2002) Cell 110:563-74; McManus y Sharp (2002) Nature Rev. Genetics 3:737-47.

30 El ARNi logra la degradación del ARNm a través de una trayectoria endógena que incluye el complejo de proteínas DICER. DICER escinde moléculas de ARNs largas en fragmentos cortos de aproximadamente 20 nucleótidos, denominados ARN interferente pequeño (siARN, por sus siglas en inglés). El siARN se desenrolla en dos ARNs monocatenarios: la cadena de pasajeros y la cadena guía. La cadena de pasajeros se degrada y la cadena guía se incorpora al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés). Los ácidos micro ribonucleicos (miARNs) son moléculas estructuralmente muy similares que se escinden de las moléculas precursoras que contienen un "lazo" polinucleotídico que conecta las cadenas de pasajero y guía hibridadas, y pueden incorporarse de manera similar en RISC. El silenciamiento génico postranscripcional ocurre cuando la cadena guía se une específicamente a una molécula de ARNm complementaria e induce la escisión por parte de Argonaute, el componente catalítico del complejo RISC. Se sabe que este proceso se propaga sistémicamente por todo el organismo a pesar de las concentraciones inicialmente limitadas de siARN y/o miARN en algunos eucariotas, tales como plantas, nemátodos y algunos insectos.

40 La patente de Estados Unidos 7,612,194 y las publicaciones de patente de Estados Unidos Nos. 2007/0050860, 2010/0192265, y 2011/0154545 describen una biblioteca de 9112 secuencias de etiquetas de secuencias expresadas (EST, por sus siglas en inglés) aisladas a partir de *D. v. virgifera* LeConte pupae. Se sugiere en la patente de Estados Unidos 7,612,194 y la publicación de patente de Estados Unidos No. 2007/0050860 enlazar operativamente a un promotor una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una de varias secuencias parciales particulares de *D. v. Virgifera* tipo vacuolar H⁺-ATPasa (V-ATPasa) descrita en el mismo para la expresión de ARN antisentido en células vegetales. La publicación de patente de Estados Unidos No. 2010/0192265 sugiere unir operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia parcial particular de un gen de *D. v. virgifera* de función desconocida y no descrita (se establece que la secuencia parcial es 58 % idéntica al producto génico C56C10.3 en *C. elegans*) para la expresión de ARN antisentido en células vegetales. La publicación de patente de Estados Unidos No. 2011/0154545 sugiere unir operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que sea complementaria a dos secuencias parciales particulares de genes de la subunidad beta del coatómero de *D. v. Virgifera* para la expresión de ARN antisentido en células vegetales. Además, la patente de Estados Unidos 7,943,819 describe una biblioteca de 906 secuencias de etiquetas de secuencias expresadas (EST) aisladas de larvas, pupas e intestinos disecados de *D. v. Virgifera* LeConte y sugiere unir operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia parcial particular de un gen de proteína 4b del cuerpo multivesicular cargado de *D. v. virgifera* para la expresión de ARN bicatenario en células vegetales.

60 No se proporcionan más sugerencias en la patente de Estados Unidos 7,612,194 y las publicaciones de patente de Estados Unidos Nos. 2007/0050860, 2010/0192265y 2011/0154545 para usar cualquier secuencia particular de las más de nueve mil secuencias enumeradas allí para la interferencia de ARN, aparte de las varias secuencias parciales particulares de V-ATPasa y las secuencias parciales particulares de genes de función desconocida. Además, ninguno de la patente de Estados Unidos 7,612,194 y las publicaciones de patente de Estados Unidos Nos. 2007/0050860 y 2010/0192265y 2011/0154545 proporciona alguna orientación sobre qué otra de las más de nueve mil secuencias proporcionadas sería letal, o incluso de cualquier otra manera útil, en especies de gusano de la raíz del maíz cuando se usa como ARNs o siARN. La patente de Estados Unidos 7,943,819 no proporciona ninguna sugerencia para usar una secuencia particular de las más de novecientas secuencias enumeradas allí para la interferencia de ARN, que no sea la

5 secuencia parcial particular de un gen de proteína 4b del cuerpo multivesicular cargado. Además, la patente de Estados Unidos 7,943,819 no proporciona orientación sobre qué otra de las más de novecientas secuencias proporcionadas sería letal, o incluso de cualquier otra manera útil, en especies de gusano de la raíz del maíz cuando se usa como ARNds o siARN. La solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. U.S. 2013/040173 y la publicación de solicitud de PCT No. WO 2013/169923 describe el uso de una secuencia derivada de un gen *Snf7* de *Diabrotica virgifera* para la interferencia de ARN en el maíz. (También descrito en Bolognesi y otros (2012) PLoS ONE 7(10): e47534. doi:10.1371/journal.pone.0047534).

10 La abrumadora mayoría de las secuencias complementarias a los ADNs del gusano de la raíz del maíz (tales como las anteriores) no proporcionan un efecto protector de las plantas de las especies del gusano de la raíz del maíz cuando se usan como ARNds o siARN. Por ejemplo, Baum y otros (2007) Nature Biotechnology 25: 1322-1326, describen los efectos de la inhibición de varios genes WCR marcados por ARNi. Estos autores informaron que 8 de los 26 genes objetivo que probaron no fueron capaces de proporcionar mortalidad de plagas de coleópteros experimentalmente significativa a una concentración de iARN muy alta (*por ejemplo*, ARNds) de más de 520 ng/cm².

15 Los autores de la patente de Estados Unidos 7,612,194 y la publicación de patente de Estados Unidos No. 2007/0050860 hicieron el primer informe de ARNi *in planta* en plantas de maíz dirigidas al gusano de la raíz del maíz occidental. Baum y otros (2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-6. Estos autores describen un sistema de ARNi dietético de alto rendimiento *in vivo* para tamizar genes objetivo potenciales para el desarrollo de maíz transgénico de ARNi. De un grupo inicial de genes de 290 objetivos, solo 14 exhibieron potencial control de larvas. Uno de los ARN bicatenarios (ARNds) más efectivos marcó a un gen que codifica la subunidad A de la ATPasa vacuolar (V-ATPasa), lo que resulta en una supresión rápida del ARNm endógeno correspondiente y desencadena una respuesta específica de ARNi con bajas concentraciones de ARNds. Por lo tanto, estos autores documentaron por primera vez el potencial para el ARNi *in planta* como una posible herramienta para el manejo de plagas, al tiempo que demuestra simultáneamente que los objetivos efectivos no pueden identificarse con precisión *a priori*, incluso a partir de un conjunto relativamente pequeño de genes candidatos.

25 El documento WO 2012/092544 A2 describe secuencias de ácido nucleico de *Diabrotica virgifera* para el control de plaga de coleópteros a través de la interferencia de ARN.

30 Resumen de la descripción

En un primer aspecto, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ácido ribonucleico de horquilla (hpARN) con una estructura de tallo y lazo que es capaz de inhibir la expresión de un gen objetivo endógeno en una célula de un insecto coleóptero tras la ingestión, en donde el polinucleótido está operativamente unido a un promotor heterólogo, y en donde el polinucleótido comprende: una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polirribonucleótido de la molécula de hpARN, en donde la primera secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:84, el complemento de al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:84, al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:86, el complemento de al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:86, al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:88, el complemento de al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:88, al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:93 y el complemento de al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:93; una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polirribonucleótido de la molécula de hpARN; y una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un polirribonucleótido de la molécula de hpARN, en donde la tercera secuencia de nucleótidos es sustancialmente el complemento inverso de la primera secuencia de nucleótidos, de manera que los polirribonucleótidos codificados por la primera y la tercera secuencias de nucleótidos se hibridan en una estructura de tallo de la molécula de hpARN, en donde una estructura de lazo de la molécula de hpARN comprende el polirribonucleótido codificado por la segunda secuencia de nucleótidos.

50 En un segundo aspecto, la invención se refiere a la molécula de ácido ribonucleico de horquilla (hpARN) codificada por el polinucleótido de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención que es capaz de inhibir la expresión de un gen objetivo endógeno en una célula de un insecto coleóptero tras la ingestión, la molécula de hpARN comprende: el primer polirribonucleótido codificado por la primera secuencia de nucleótidos; el segundo polirribonucleótido codificado por la segunda secuencia de nucleótidos; y el tercer polirribonucleótido codificado por la tercera secuencia de nucleótidos, en donde los polirribonucleótidos primero y tercero se hibridan en una estructura de tallo de la molécula de hpARN.

55 En otro aspecto, la invención se refiere a una célula transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

60 En aspectos adicionales, la invención se refiere a una planta transgénica o una semilla de planta transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en donde el promotor heterólogo es funcional en una célula vegetal.

65 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para controlar una población de insectos coleópteros, el método comprende alimentar insectos de la población con un agente que comprende el hpARN de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

- 5 En otro aspecto más, la invención se refiere a un método para producir una célula vegetal transgénica, el método comprende: transformar una célula vegetal con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en donde el promotor heterólogo es funcional en una célula vegetal y en donde la molécula es un vector de transformación vegetal; cultivar la célula vegetal transformada en condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo celular vegetal que comprende una pluralidad de células vegetales transformadas; seleccionar células vegetales transformadas que han integrado el polinucleótido en sus genomas; tamizar las células vegetales transformadas para la expresión de la molécula de hpARN codificada por el polinucleótido; y seleccionar una célula vegetal que expresa la molécula de hpARN.
- 10 En otro aspecto más, la invención se refiere a un método para producir una planta transgénica resistente a plagas de coleópteros, el método comprende: regenerar una planta transgénica a partir de la célula vegetal transgénica de acuerdo con la invención, en donde la expresión de la molécula de ARN codificada por el polinucleótido es suficiente para reducir la expresión de un gen objetivo en una plaga de coleópteros que ingiere una célula de la planta transgénica.
- 15 En la presente descripción se describen moléculas de ácido nucleico (*por ejemplo*, genes objetivo, ADNs, ARNdss, siARNs, miARNs, shARNs y hpARNs), y métodos de uso de estos, para el control de plagas de insectos, incluidas, por ejemplo, plagas de coleópteros, tales como *D. v. Virgifera* LeConte (gusano de la raíz del maíz occidental, "WCR"); *D. barberi* Smith y Lawrence (gusano de la raíz del maíz del norte, "NCR"); *D. u. howardi* Barber (gusano de la raíz del maíz del sur, "SCR"); *D. v. zea* Krysan y Smith (gusano de la raíz del maíz mexicano, "MCR"); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. speciosa* Germar *D. u. undecimpunctata* Mannerheim y *Meligethes aeneus* Fabricius (escarabajo del polen, "PB"). En ejemplos particulares, se describen moléculas de ácido nucleico ilustrativas que pueden ser homólogas a, al menos, una porción de uno o más ácidos nucleicos nativos en una plaga de insectos.
- 25 En estos y otros ejemplos, la secuencia de ácido nucleico nativo puede ser un gen objetivo, cuyo producto puede estar, por ejemplo y sin limitación: involucrado en un proceso metabólico; involucrado en un proceso reproductivo; o involucrado en el desarrollo larvario. En algunos ejemplos, la inhibición postranscripcional de la expresión de un gen objetivo por una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido homólogo a la misma puede ser letal para una plaga de insectos o resultar en un crecimiento y/o desarrollo reducido de una plaga de insectos. En ejemplos específicos, *nucampholin* (referido en la presente descripción como *ncm*) puede seleccionarse como un gen objetivo para el silenciamiento postranscripcional. En ejemplos particulares, un gen objetivo útil para la inhibición postranscripcional es un gen nuevo referido en la presente descripción como *Diabrotica ncm* (*por ejemplo*, SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:77). En ejemplos particulares, un gen objetivo útil para la inhibición postranscripcional es un gen nuevo referido en la presente descripción como *Meligethes ncm* (*por ejemplo*, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88 y SEQ ID NO:93). Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende el polinucleótido de SEQ ID NO:1; el complemento de SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:77; el complemento de SEQ ID NO:77; SEQ ID NO:84; el complemento de SEQ ID NO:84; SEQ ID NO:86; el complemento de SEQ ID NO:86; SEQ ID NO:88; el complemento de SEQ ID NO:88; SEQ ID NO:93; el complemento de SEQ ID NO:93; y/o fragmentos de cualquiera de los anteriores (*por ejemplo*, SEQ ID NOs: 3-6 y 90) se describen, por lo tanto, en la presente descripción.
- 30 También se describen moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido que es al menos alrededor de 85 % idéntico a una secuencia de aminoácidos dentro de un producto génico objetivo (*por ejemplo*, el producto de un gen *ncm*). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido que es al menos 85 % idéntico a un *Diabrotica* NCM (*por ejemplo*, SEQ ID NO:2); un *Meligethes* NCM (*por ejemplo*, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89 y SEQ ID NO:94); y/o una secuencia de aminoácidos dentro de un producto de un *Diabrotica ncm* o un *Meligethes ncm*. Además, se describen moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que es el complemento inverso de un polinucleótido que codifica un polipéptido al menos 85 % idéntico a una secuencia de aminoácidos dentro de un producto génico objetivo.
- 35 También se describen polinucleótidos de ADNc que pueden usarse para la producción de moléculas de iARN (*por ejemplo*, ARNdss, siARN, shARN, miARN y hpARN) que son complementarios a todo o parte de un gen objetivo de plagas de insectos, por ejemplo, un gen *ncm*. En modalidades particulares, se pueden producir hpARN *in vitro* o *in vivo* por un organismo genéticamente modificado, tal como una planta o bacteria. En ejemplos particulares, se describen moléculas de ADNc que pueden usarse para producir moléculas de iARN que son complementarias a todo o parte de un *Diabrotica ncm* (*por ejemplo*, SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:77) o un *Meligethes ncm* (*por ejemplo*, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88 y SEQ ID NO:93).
- 40 Además, se describen medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros, y medios para proporcionar resistencia a plagas de coleópteros a una planta. Un medio para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros es una molécula de ARN monocatenaria o bicatenaria que consiste de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 79-82; y complementos de estos. Los equivalentes funcionales de los medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros incluyen moléculas de ARN monocatenarias o bicatenarias que son sustancialmente homólogas a todo o parte del complemento del producto de expresión de ARN de un gen *ncm* de un organismo del orden de los coleópteros, que comprende la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88 o SEQ ID NO:93. Un medio para proporcionar resistencia a plagas de coleópteros a una planta es una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un medio para inhibir la

expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros operativamente unido a un promotor, en donde la molécula de ADN es capaz de integrarse dentro del genoma de una planta de maíz.

5 Se describen métodos para controlar una población de plagas de insectos (*por ejemplo*, una plaga de coleópteros), que comprende proporcionar a una plaga de insectos (*por ejemplo*, una plaga de coleópteros) una molécula de iARN (*por ejemplo*, ARNdS, siARN, shARN, miARN y hpARN) que funciona tras ser absorbido por la plaga para inhibir una función biológica dentro de la plaga, en donde la molécula de iARN comprende todo o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID NO:78; el complemento de SEQ ID NO:78; SEQ ID NO:79; el complemento de SEQ ID NO:79; SEQ ID NO:80; el complemento de SEQ ID NO: 80; SEQ ID NO:81; el complemento de SEQ ID NO:81; SEQ ID NO:82; el complemento de SEQ ID NO:82; SEQ ID NO:83; el complemento de SEQ ID NO:83; un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* (*por ejemplo*, WCR) que comprende todo o parte de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:77; el complemento de un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Diabrotica* que comprende todo o parte de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:77; SEQ ID NO:95; el complemento de SEQ ID NO:95; SEQ ID NO:96; el complemento de SEQ ID NO:96; SEQ ID NO:97; el complemento de SEQ ID NO:97; SEQ ID NO:98; el complemento de SEQ ID NO:98; SEQ ID NO:99; el complemento de SEQ ID NO:99; un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* (*por ejemplo*, PB) que comprende todo o parte de cualquiera de las SEQ ID NOs: 84, 86, 88 y 93; y el complemento de un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende todo o parte de cualquiera de las SEQ ID NOs: 84, 86, 88 y 93.

20 En modalidades particulares, un iARN que funciona tras ser absorbido por una plaga de insectos para inhibir una función biológica dentro de la plaga se transcribe a partir de un ADN que comprende todo o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: ; SEQ ID NO:84; el complemento de SEQ ID NO:84; SEQ ID NO:86; el complemento de SEQ ID NO:86; SEQ ID NO:88; el complemento de SEQ ID NO:88; SEQ ID NO:93; el complemento de SEQ ID NO:93; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* (*por ejemplo*, PB) que comprende todo o parte de cualquiera de las SEQ ID NOs: 84, 86, 88 y 93; y el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende todo o parte de cualquiera de las SEQ ID NOs: 84, 86, 88 y 93.

30 También se describen en la presente descripción métodos en donde se pueden proporcionar ARNdS, siARNs, shARNs, miARNs y/o hpARNs a una plaga de insectos en un ensayo basado en la dieta, o en células vegetales genéticamente modificadas que expresan los ARNdS, siARNs, shARNs, miARNs y/o hpARNs. En estos y otros ejemplos, los ARNdS, siARNs, shARNs, miARNs y/o hpARNs pueden ser ingeridos por la plaga. La ingestión de ARNdS, siARNs, shARNs, miARNs y/o hpARNs como lo descrito en la presente descripción entonces puede resultar en ARNi en la plaga, lo que a su vez puede resultar en el silenciamiento de un gen esencial para la viabilidad de la plaga y, conduce en última instancia a la mortalidad. Por lo tanto, se describen métodos en donde se describen moléculas de ácido nucleico que comprenden polinucleótidos ilustrativos útiles para el control parental de plagas de insectos de una plaga de insectos. En ejemplos particulares, una plaga de coleópteros controlada mediante el uso de moléculas de ácido nucleico de la invención puede ser WCR, NCR, SCR, *D. undecimpunctata howardi*, *D. balteata*, *D. undecimpunctata tenella*, *D. speciosa*, *D. u. undecimpunctata*, o *Meligethes aeneus*.

40 Las características anteriores y otras se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias modalidades, que procede con referencia a las figuras acompañantes 1-2.

45 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 incluye una representación de una estrategia usada para proporcionar ARNdS a partir de un solo molde de transcripción con un solo par de cebadores.

La Figura 2 incluye una representación de una estrategia usada para proporcionar ARNdS a partir de dos moldes de transcripción.

50 Listado de secuencias

Las secuencias de ácido nucleico enumeradas en el listado de secuencias acompañantes se muestran mediante el uso de las abreviaturas de letras estándares para las bases nucleotídicas, como se define en 37 C.F.R. § 1.822. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos enumeradas definen moléculas (*es decir*, polinucleótidos y polipéptidos, respectivamente) que tienen los monómeros de nucleótidos y aminoácidos dispuestos de la manera descrita. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos enumeradas definen un género de polinucleótidos o polipéptidos que comprenden los monómeros de nucleótidos y aminoácidos dispuestos de la manera descrita. En vista de la redundancia del código genético, se debe entender que una secuencia de nucleótidos que incluye una secuencia codificante también describe el género de polinucleótidos que codifican el mismo polipéptido como un polinucleótido que consiste de la secuencia de referencia. Se entenderá además que una secuencia de aminoácidos describe el género de los polinucleótidos ORF que codifican ese polipéptido.

65 Se muestra solo una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria se incluye mediante cualquier referencia a la cadena mostrada. Como el complemento y el complemento inverso de una secuencia de ácido nucleico primaria se describen necesariamente por la secuencia primaria, la secuencia

complementaria y la secuencia complementaria inversa de una secuencia de ácido nucleico se incluyen por cualquier referencia a la secuencia de ácido nucleico, a menos que se establezca explícitamente que es de cualquier otra manera (o está claro que es de cualquier otra manera a partir del contexto en el que aparece la secuencia). Además, como se entiende en la técnica, la secuencia de nucleótidos de una cadena de ARN está determinada por la secuencia de ADN a partir de la cual se transcribió (pero por la sustitución de las nucleobases de uracilo (U) por timina (T)), una secuencia de ARN se incluye por cualquier referencia a la secuencia de ADN que la codifica. En el listado de secuencia acompañante:

La SEQ ID NO:1 muestra un marco de lectura abierto de ADN ilustrativo *Diabrotica ncm*:

10 ATGCCAGATACCAAGGATGCCAAGGATACCAAGGATGCTAATTTGAGTTCTCCTGA
 ACGTAAAAGACGAAGAAAGAGTAGATCTAAATCTCCAGAACGAAAAGAGAAAAAGT
 CTTCCAAAAAGAAAGCCCACAATAGTAGAGACAGAGATTCATCAGAGGAAGGTTAC
 15 AACCCCTAAAGATTATCAGAGATACTATGGGGAAGATCGCCCAAACAGTGACAAATA
 TTGGAATAAATATCCAAGGAAAGATACTACCAAAGTTGGCCAAAGATACTATGATG
 CGGCTCCCGAAGAATCTGGCAAGAAGGGGCCAGATAGAAATTCAGAGGAGAAGGAG
 TTACCAAAGCCAATGGAGTCTGTTTCTGATAAATCAGTCATCAAACCAAGAGAAAG
 AAAAAGTGTAGATATGTTAACATCGAGGACTGGTGGTGCTTATATTTCCCCAGCTA
 20 AGCTACGATTGTTACAAGCCAGTATTACAGACAAAACATCAGCAGCCTATCAGCGT
 ATAGCATGGGAAGCCTTAAAGAAATCCGTTTCATGGTTACATTAATAAAATTAACAC
 CTCGAATATTGGCATCATCGCCAGAGAATTATTGCATGAAAATATAGTAAGAGGTA
 GAGGTTTGCTGTGCAAGTCAATAATACAAGCACAAGCAGCATCTCCTACTTTTACA
 25 AACGTTTACGCAGCCTTAGTAGCTGTTATTAATTCTGAAGTTTCCAAGTATAGGAGA
 GCTTTTATTGAAGAGGTTGGTTTTGCAGTTCAAAGAGGGTTTTAAACAAAATAATA
 AGTCTATTTGCATATCGGCTACTACTTTTCGTAGCTCATTTAGTAAATCAGAGAGTG
 30 GCACATGAAATTTGGCTTTGGAGATACTTACATTGTTGGTGGAGACTCCTACAGA
 TGATTCTGTGGAGGTGGCCATTTCAATTTTGAAGGAATGTGGACAAAAGTACAG
 AAGTTTCAAGTAGAGGTATTACTGCTATATTTGAGATGTTAAGAAACATTTTACAT
 GAAGGCCAGCTAGAAAAAAGAATTCAGTACATGATTGA

La SEQ ID NO:2 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido NCM de *Diabrotica* codificado por un ADN ilustrativo *Diabrotica ncm*:

40 MRGGVSDDMTSTCVQGGIRP IGRYQP NMLMEP SSPQSAWQFHPAMPKREPVDHDGR
 NDSGLASGGEF I SSSPGSDNSEHFSASYSSPTSCHTIVISTNTYYPTNLRPSSQAQT
 SIPTHMMYTGDHNPLTPPNSEPMISPKSVLSRNNEGEHQTTLTPCASPEDASVDAT
 DSVNCDGALKKLQATFEKNAFSESGDDDTKSDGEAEYDEQGLRVPKVNSHGKIK
 45 TFKCKQCDFVAITKLVFWEHTKLHIKADKLLKCPKCFVTEYKHHLEYHLRNHYGS
 KPFKCNQCSYSCVNKSMNLNSHLKSHSNIYQYRCSDCSYATKYCHSLKLHLRKYSHK
 PAMVLNPDGTPNPLPIIDVYGTRRGPKMKSEQKSSEEMSPKPEQVLPFPFNQFLPQ
 MQLPFPGFPLFGGFPGGIPNPLLLQNLEKLARERRESMNSSERFSPAQSEQMDTDA
 50 GVLDSLKPDDSSQTNRRKDSAYKLSGDNSSDEEDDEATTTMFGNVEVVENKELED
 TSSGKQTP TSAKKDDYSCQYCQINFGDPVLYTMHMGYHGYKNPFI CNMCGEECNDK
 VSFFLHIARNPHS

55 GATGCGGCTCCCGAAGAATCTGGCAAGAAGGGGCCAGATAGAAATTCAGAGGAGAA
 GGAGTTACCAAAGCCAATGGAGTCTGTTTCTGATAAATCAGTCATCAAACCAAGAG
 AAAGAAAAACTGTAGATATGTTAACATCGAGGACTGGTGGTGCTTATATTTCCCCCA
 GCTAAGCTACGATTGTTACAAGCCAGTATTACAGACAAAACATCAGCAGCCTATCA
 60 GCGTATAGCATGGGAAGCCTTAAAGAAATCCGTTTCATGGTTACATTAATAAAATTA
 ACACCTCGAATATTGGCATCATCGCCAGAGAATTATTGCATGAAAATATAGTAAGA
 GGTAGAGGTTTGTGTGCAAGTCAATAATACAAGCACAAGCAGCATCTCCTACTTT
 65 TACAAACGTTTACGCAGCC

CCCTTAGTAAAGAAATCTTAGGCAGTGATGGTGTGAGTCTGAATCAGGTTC CGAAGGT
 TCAGAAGAGGAATCTGATAATGAAAATGAGGACGAAGTCAAGGACCAGGGAACAAT
 TATTGACAATACTGAAACGAATTTAATTTCTCTTAGAAGAACCATATATTTGACTA
 5 TTCAGTCTAGTTTAGATTTTGAAGAATGTGCACATAAGCTACTGAAGATGGAGTTG
 AAACCTGGACAAGAAATAGAATTGTGTACATGTTTCTTGACTGCTGCGCAGAACA
 AAGAACCTACGAAAAGTTTTATGGTCTTTTGGCTCAAAGATTTTGTCAAATCAACA
 AAGTGTATATCGAGCCTTTCCAACAAATTTTTAAAGATACCTATTCTACCACTCAC
 10 AGACTAGATGCTAAC

CAGTCATCAAACCAAGAGAAAAGAAAACCTGTAGATATGTTAACATCGAGGACTGGT
 15 GGTGCTTATATTTCCCCCAGCTAAGCTACGATTGTTACAAGCCAGTATTACAGACAA
 AACATCAGCAGCCTATCAGCGTATAGCATGGGAAGCCTTAAAGAAATCCGTTTCATG
 GTTACATTAA

ATTGGCATCATCGCCAGAGAATTATTGCATGAAAATATAGTAAGAGGTAGAGGTTT
 20 GCTGTGCAAGTCAATAATACAAGCACAAAGCAGCATCTCCTACTTTTACAAACGTTT
 ACGCAGCC

25 La SEQ ID NO:7 muestra la secuencia de nucleótidos de un promotor de fago T7.

La SEQ ID NO:8 muestra un gen ilustrativo *YFP*.

Las SEQ ID NOs: 9-16 muestran cebadores usados para la amplificación por PCR de secuencias *ncm* que comprenden *ncm* reg1, *ncm* reg2, *ncm* v1, y *ncm* v2, usados en algunos ejemplos para la producción de ARNs.

30 La SEQ ID NO:17 muestra un ADN ilustrativo que codifica un ARN *Diabrotica ncm* v2; que contiene un polinucleótido de sentido, una secuencia de lazo (subrayado) y un polinucleótido antisentido (fuente en **negrita**):

GGCTGCGTAAACGTTTGTAAAAGTAGGAGATGCTGCTTGTGCTTGTATTATTGACT
 35 TGCACAGCAAACCTCTACCTCTTACTATATTTTCATGCAATAATTCTCTGGCGATG
 ATGCCAATGAAACTAGTACCAGTCATCACGCTGGAGCGCACATATAGGCCCTCCAT
CAGAAAGTCAATTGTGTATATCTCTCATAGGGAACGAGCTGCTTGCCTATTTCCCTT
CCGTAGTCAGAGTCATCAATCAGCTGCACCGTGTTCGTAAGCGGGACGTTTCGCAAG
 40 CTCGTCCGCGTTA**ATTGGCATCATCGCCAGAGAATTATTGCATGAAAATATAGTA**
AGAGGTAGAGGTTTGCTGTGCAAGTCAATAATACAAGCACAAAGCAGCATCTCCTAC
TTTTACAAACGTTTACGCAGCC

45 La SEQ ID NO:18 muestra un ADN ilustrativo que codifica un *YFP* v2

ATGTCATCTGGAGCACTTCTCTTTTCATGGGAAGATTCCTTACGTTGTGGAGATGGA
 AGGGAATGTTGATGGCCACACCTTTAGCATAACGTGGGAAAGGCTACGGAGATGCCT
 50 CAGTGGGAAAGGTTGATGCACAGTTCATCTGCACAACCTGGTGTGTTCTGTGCCT
 TGGAGCACACTTGTACCCTCTCACCTATGGAGCACAGTGCTTTGCCAAGTATGG
 TCCAGAGTTGAAGGACTTCTACAAGTCTGTATGCCAGATGGCTATGTGCAAGAGC
 GCACAATCACCTTTGAAGGAGATGGCAACTTCAAGACTAGGGCTGAAGTCACCTTT
 55 GAGAAATGGGTCTGTCTACAATAGGGTCAAACCTCAATGGTCAAGGCTTCAAGAAAGA
 TGGTCATGTGTTGGGAAAGA AACTTGGAGTTCAACTTCACTCCCCACTGCCTCTACA
 TCTGGGGTGACCAAGCCAACCACGGTCTCAAGTCAGCCTTCAAGATCTGTCATGAG
 ATTACTGGCAGCAAAGGCGACTTCATAGTGGCTGACCACACCCAGATGAACACTCC
 60 CATTGGTGGAGGTCCAGTTCATGTTCCAGAGTATCATCACATGTCTTACCATGTGA
 AACTTTCCAAAGATGTGACAGACCACAGAGACAACATGTCTTGAAGAAACTGTC
 AGAGCTGTTGACTGTGCAAGACCTACCTTTGA

65 La SEQ ID NO:19 muestra un ADN ilustrativo que comprende un lazo:

ES 2 811 279 T3

AGTCATCACGCTGGAGCGCACATATAGGCCCTCCATCAGAAAGTCATTGTGTATAT
CTCTCATAGGGAACGAGCTGCTTGCGTATTTCCCTTCCGTAGTCAGAGTCATCAAT
CAGCTGCACCGTGTTCGTAAGCGGGACGTTTCGCAAGCTCGT

5

La SEQ ID NO:20 muestra un gen ilustrativo *YFP*.

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

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

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

10 La SEQ ID NO:24 muestra una secuencia de ADN de *beta espectralina 2* región 2.

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

La SEQ ID NO:26 muestra una secuencia de ADN de *mtRP-L4* región 2.

Las SEQ ID NOs: 27-54 muestran cebadores usados para amplificar regiones génicas de *anexina*, *beta espectralina 2*, *mtRP-L4*, y *YFP* para la síntesis de ARNs.

15 La SEQ ID NO:55 muestra una secuencia de ADN de maíz que codifica una proteína similar a TIP41.

La SEQ ID NO:56 muestra la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido cebador T20VN.

Las SEQ ID NOs: 57-61 muestran cebadores y sondas usadas para el análisis de la expresión de transcripción de ARNs.

20

La SEQ ID NO:62 muestra una secuencia de nucleótidos de una porción de una región codificante *SpecR* usada para la detección de la cadena principal de vectores binarios.

La SEQ ID NO:63 muestra una secuencia de nucleótidos de una región codificante *AAD1* usada para el análisis del número de copias genómicas.

La SEQ ID NO:64 muestra una secuencia de ADN de un gen de *invertasa* de maíz.

25

Las SEQ ID NOs: 65-73 muestran las secuencias de nucleótidos de los oligonucleótidos de ADN usados para las determinaciones del número de copias de genes y la detección de la cadena principal del vector binario.

Las SEQ ID NOs: 74-76 muestran cebadores y sondas usadas para el análisis de la expresión de transcripción de ARNs del maíz.

La SEQ ID NO:77 muestra un cóntigo que comprende un ADN de *Diabrotica ncm* ilustrativo:

30

ATTACCAAATGTCAATGTCACTCATTACTCATTACCAAATGTCAATGTCACTGTCA
GGTAACGTGCAATGCAAATTGTCAATGTCAAACCTTAAAAATATTTTCCCTGCAACTG

CATCAAATTGTAAATTTTTATTTTTTTTAAATATGCCAGATACCAAGGATGCCAAGG
ATACCAAGGATGCTAATTTGAGTTCTCCTGAACGTAAAAGACGAAGAAAGAGTAGA

35

TCTAAATCTCCAGAACGAAAAGAGAAAAAGTCTTCCAAAAAGAAAGCCACAATAG
TAGAGACAGAGATTTCATCAGAGGAAGGTTACAACCCTAAAGATTATCAGAGATACT

ATGGGGAAGATCGCCCAAACAGTGACAAATATTGGAATAAATATCCAAGGAAAGAT
ACTACCAAAGTTGGCCAAAGATACTATGATGCGGCTCCCGAAGAATCTGGCAAGAA

40

GGGGCCAGATAGAAATTCAGAGGAGAAGGAGTTACCAAAGCCAATGGAGTCTGTTC
CTGATAAATCAGTCATCAAACCAAGAGAAAGAAAACTGTAGATATGTTAACATCG

AGGACTGGTGGTGCTTATATCCCCCAGCTAAGCTACGATTGTTACAAGCCAGTAT
TACAGACAAAACATCAGCAGCCTATCAGCGTATAGCATGGGAAGCCTTAAAGAAAT

45

CCGTTTCATGGTTACATTAATAAAATTAACACCTCGAATATTGGCATCATCGCCAGA
GAATTATTGCATGAAAATATAGTAAGAGGTAGAGGTTTGCTGTGCAAGTCAATAAT

50

55

60

65

ES 2 811 279 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45

ACAAGCACAAGCAGCATCTCCTACTTTTACAAACGTTTACGCAGCCTTAGTAGCTG
TTATTAATTCGAAGTTTCCAAGTATAGGAGAGCTTTTATTGAAGAGGTTGGTTTTG
CAGTTCAAAGAGGGTTTAAACAAAATAATAAGTCTATTTGCATATCGGCTACTAC
TTTCGTAGCTCATTTAGTAAATCAGAGAGTGGCACATGAAATTTTGGCTTTGGAGA
TACTTACATTGTTGGTGGAGACTCCTACAGATGATTCTGTGGAGGTGGCCATTTCA
TTTTTGAAGGAATGTGGACAAAACCTGACAGAAAGTTTCAAGTAGAGGTATTACTGC
TATATTTGAGATGTTAAGAAACATTTTACATGAAGGCCAGCTAGAAAAAAGAATT
CAGTACATGATTGAAGTTATGTTTCAAATAAGGAAAGACGGATTTAAGGATCATGC
TGCTGTCGTAGAAGAATTAGATTTAGTAGAAGAGGAAGATCAATTCCTCATCTTA
TTATGTTAGATGATGTTAAAGAGGCTGATGCAGAGGATATATTGAATGTGTTCAA
TTTGATGAGAGTTATGAAGAAAATGAAGATAAATACAAAACCCTTAGTAAAGAAAT
CTTAGGCAGTGATGGTGAAGTCTGAATCAGGTTCCGAAGGTTTCAAGAGGAATCTG
ATAATGAAAATGAGGACGAAGTCAAGGACCAGGGAACAATTATTGACAATACTGAA
ACGAATTTAATTTCTCTTAGAAGAACCATATATTTGACTATTCAGTCTAGTTTAGA
TTTTGAAGAAATGTGCACATAAGCTACTGAAGATGGAGTTGAAACCTGGACAAGAAA
TAGAATTGTGTCACATGTTTCTTACTGCTGCGCAGAACAAGAACCCTACGAAAAG
TTTTATGGTCTTTTGGCTCAAAGATTTTGTCAAATCAACAAAGTGTATATCGAGCC
TTTCCAACAAATTTTAAAGATACCTATTCTACCCTCACAGACTAGATGCTAACA
GGTTAAGAAACGTCAGCAAATTTTGGCGATTTACTTTTTACGGATGCCATTGGA
TGGGAAGTCCCTGACATCATGAAATTGAATGAAGAGGATACCAATAGTTCTAGTAG
GATTTTCATAAAAATCTTGTTCAGAATTGGCTGAATATATGGGACTAGGAAAAT
TAAACGCAAGGCTAAAGGATGAGACCCTGCAGGCTTATTTTTCAGGACTGTTTCCT
AGAGATAACCCAAAGAATACCAGATTTTCTATTAATTTTTTTTACCTCTATCGGTTT
GGGAGGATTAAGTGAAGTCAAGACTCAGAGAACATTTAAAAAATATTCCAAAATGATGG
AAATGAAGTTAGCCACTAAAGAAAAGGAAAGCAGTGGTAGTAGTTCAGAAAGT
AGTTCTGAGGAAGATAGTAGTGACGACAGCTCTGAAGATTCATCAAGTTCTGAAGA
CGATAGAGGCAAAAAGAAGAAAAAACCAAAAGCTAGAAGAAAAAATTCGAAAG
TAAATTCTAAGTCTAGACCTAGATCAAAGAGAAAGAACACGCAGACAAACCTAGA
GACAAACATAGAAAGGAAGATAGACATAAATCTGACAAAATCCCGATAGATCCTC
GTCCAAAATATTCTAAAGAAGATAACAAGAGGAAGAAAGACTACGAATGGATGA
AGAGCAGATATGAAGATGATATTAAGCAATTAAAAACGATAAAAGGGTATTTGAA
AAGTCTTCAAACGACGATCAAGATCTAGAGACAGGGTAAAAGTCAAGGAAGAGCG
TAGACGTAGAAGCAGAGAAAGAAGGAGCTAAGATAATTTTTTAATAAGGATCT
ATGTATATTTATGTAAACATTTATTTAATACATGTTTTTTAAAAAAA

Las SEQ ID NOs: 78-83 muestran ARN ilustrativos transcritos a partir de ácidos nucleicos que comprenden polinucleótidos ilustrativos de *Diabrotica ncm* y fragmentos de estos.

50 La SEQ ID NO:84 muestra un cóntigo que comprende un ADN ilustrativo *Meligethes aeneus ncm*:

55

60

65

ES 2 811 279 T3

GCAATTTTCGTTTTTGAAGGAAAGTGGTCAAAAACCTCACTGAGGTGTCGAGTAAAGG
TATCAATGCCATATTTGAGATGTTGAGGAATATTCTGCATGAAGGACAGTTGGAGA
AGAGAATACAGTACATGATTGAAGTCATGTTCCAAGTTCGGAAAGATGGTTTCAAG
5 GATCATGCTGCTGTTACTGAAGAACTAGATATTGTTGAAGAGGAAGATCAGTTTAC
TCACCTAATCACATTGGATGATGTTAAACAAGCTAACTCAGAGGATATATTGAATG
TGTTTAAATTTGATGATAAATATGAGGAAAATGAGGGTAAATACAAAACCTTTAAGT
10 AAGGAAATTCTCCAGTCAGACAGTGAATCAGGCGAATCTGGTTCAGAGGGGTCTGA
AGAAGACTCGGAAGATGAAGAAGGTGAAGAAGATGAAACCAAAAATCAAACCATTA
TTGATAACACAGAACTAATTTAATCACCTTAAGGAGAACCATCTATCTCACAATA
CAATCCAGTTTGGATTTTGAAGGAAATGTGCCATAAATTGATGAAAATGGAGATCAA
15 ACCTGGACAAGAGATTGAATTGTGTACATGTTCCCTTGATTGTTGCGCTGAACAGC
GTACCTACGAAAAATTCTTCGGCCTCCTCTCGCAGCGCTTCTGCCAAATAAACAAG
ACTTTCATCGAACCGTTCCAACAAATTTTCAAAGATACCTATTCCACAACCTCACAG
ACTTGACGCCAATCGATTGAGAAACGTTAGCAAATTTCTTCGCGCATTATTGTTTCA
20 CCGACGCCATCGGCTGGGAAGTGCTCGATATCATGAAATTAACGAGGAAGACACC
AACAGTTCAGCAGGATTTTCATCAAGATTTTGTTCAGGAGTTGTCCGAATATAT
GGGATTAGCGAAGTTGAATAAAAGGCTAAAGGATGAAACTTTACAGGAATATTTTCG
CGGGGCTATTTCCGAGGGATAACCCGAAGAACACGCGTTTCGCCATCAATTTTTTC
25 ACGTCGATCGGTTTAGGAGGTCTAACGGACGAGTTGAGGGAGCACTTGAAAAACGT
GCCAAAACATCTGGAAGTGATGGCTTTGAAAGCAGATTCGAGCAGCTCTAGCAGCA
GTAGCAGCAGTTCAGTAACGATTCCAGCAGCAGTTCAGATTCTTCCGATGACGAG
GGTTCAGGAAGAAGAAAACAAAAAATTGAAAACCCCGGACAAAAAGAAGAAACA
30 GAAAGAAGATGAAAAACCCAAAAAGAAAAGCGAGGATAAACCAGGAACAAACCAG
ACTATAGAGATAGAAGAAACGACGACAGGGAAAAGTTTAAAAAATACAGAAACAAC
GACGAAGAAAGCCACAGAAGAAGCAGAGAAGATGCAAGAGAAAAATACAGAGGTCA
CGAGGAAAGAAGAAGCGACCACAGAGAAGAATACCGGCCGAGAGAACATAGAGGTA
35 GAGATAGACGTTAGTTGTATAATAATGTATATTTTTTTCGTATTTAATAAAATAAAT
TATACATTTTATAGTGTTCGAGCATTACCAAGCAAGGGTTTTACTTTTCGGATA
GCAATGGTGTAGTACGTTTTTGAAGGTGTCCACACACACCAAGCCGGTTTTATCTA
40 AATCTAGAGCTATCTTCCAAAAGTCTTCAAAGGA

La SEQ ID NO:85 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido NCM de *Meligethes aeneus* codificado por un ADN ilustrativo *Meligethes aeneus ncm*:

AISFLKESGQKLTEVSSKGINAIFEMLRNILHEGQLEKRIQYMI EVMFQVRKDGFK
45 DHA AVTEELDIVEEEDQFTHLITLDDVKQANSEDI LN VF KFDDKYEENEGKYK TLS
KEILQSDSESGESGSEGSEEDSEDEEGEEDETKNQTIIDNTE TNLITLRTIYLT I
QSSLD FE ECAHKLKMEIKPGQEIELCHMFLDCCAEQRTYEKFFGLLSQRFCQINK
50 TFI EPFQ QIFKDTYSTHRLDANRLRNVS KFFAHL LFTDAIGWEVLDIMKLN EEDT
NSSSRIFIKILFQELSEYMG LAKLNKRLKDETLQEYFAGLFPRDNPKNTRFAINFF
TSIGLGLTDELREHLKNVPHLEVMALKADSSSSSSSSSSSSNDSSSSSDSSDDE
55 GSRKKKTKKLKTPDKKKKQKEDEKPKKKSSEDKPRNKPDYRDRRNDREKFKKYRNN
DEESHRRSREDAREKYRGHEERRSDHREEYRPREHRGRDRR

La SEQ ID NO:86 muestra un cóntigo que comprende un ADN ilustrativo *Meligethes aeneus ncm*:

60

65

ES 2 811 279 T3

CCACACGAATTGACTGGTTAATTTAAAAATAAGCACAAGAAACGAATAACACTACAA
TGGTTTGAATTTACACAAAAAAAATGTAGTCACTACCATTGTAGTGTATTTCG
5 TTTCTTGTGCTTATTTTTAATTAACCAGTCAATTCGTGTGGTGTAGTGAACAAAGG
TTATAGTTATGACGACGGATTCGAGAGAGGTTCCCTACAGCTGCGGCTCCACGC
AGAAGCGCCTCGAAATCGCCAGAACCAAAAAAGCAAAGTACGATAAGAAAGAGAA
GGGCGATAAAGATCGCAAGAGGAGATCCACAGATCCAGATCTAGATCCAGGGATA
10 GAGACCATAGGGACAAACATGGTGGAAAAAACGTTACCACGACCTGGACGACCCT
TCTGAAGACTACCCAAGATATTATGGCGAGGATAGAAAACAGAACAGTGACAGATA
TTGGTCCAAGTACCCAAGAAAGACAGGGACGAATATGTTATTGGTAGCCGGTATT
ATGATGTTGAGGAAAAGAAGGAGAAAAAGAAAAAGAGGATGAAAATAAGGATAAA
15 TCCGTCATCACTCCAAGGGAAAGGAAAACAGTGGACTTACTAACATCTCGAACAGG
TGGGGCTTATATACCTCCAGCTAAATTACGTATGATGCAGGCTGAGATAACTGATA
AATCATCAGCTGCATATCAAAGAATTGCCTGGGAAGCTTTAAAAAAGTCCATTCAT
GGTTACATCAACAAAATTAACACTTCCAATATTGGTCTTATTGCTAGAGAATTACT
20 GCATGAAAACATTGTAAGAGGTAGAGGTTTGCTGTGTAAATCTATAATACAAGCAC
AGGCAGCTTCCCCGACGTTCCACCAATGTTTATGCAGCTTTAGTTGCAGTCATAAAT
TCAAAATTCCCAACATTGGAGAAGTGTACTGAAAAGGTTGGTTTTGCAGTTTAA
AAGGGTTTTCAAGCAGAACAACAAGTCTATCTGTATATCGGCTGCTACCTTTGTGC
25 CGCATTTAGTAAACCAAAGAGTGGCCACGAAATTTTAGCATTGGAAATTCTTACT
TTACTTGTGAGTCCCCACAGATGATTCAGTGGAAAGTAGCAATTTTCGTTTTTGAA
GGAAAGTGGTCAAAAACACTCACTGAGGTGTGAGTAAAGGTATCAATGCCATATTTG
AGATGTTGAGGAATATTCTGCATGAAGGACAGTTGGAGAAGAGAATACAGTACATG
30 ATGAAAGTCATGTTCCAAGTTCGGAAAGATGGTTTTCAAGGATCATGCTGCTGTTAC
TGAAGAAGTATGTTGAAGAGGAAGATCAGTTTACTCACCTAATCACATTGG
ATGATGTTAAACAAGCTAACTCAGAGGATATATTGAATGTGTTTTAAATTTGATGAT
AAATATGAGGAAAATGAGGGTAAATACAAAACTTTAAAGTAAAGGAAATTTCTCCAGTC
35 AGACAGTGAATCAGGCGAATCTGGTTCAGAGGGGTCTGAAGAAGACTCGGAAGATG
AAGAAGGTGAAGAAGATGAAACCAAAAATCAAACCATTTATTGATAACACAGAAACT
AATTTAATCACCTTAAGGAGAACCATCTATCTCACAATACAATCCAGTTTGGATTT
40 TGAGGAATGTGCCATAAATTGATGAAAATGGAGATCAAACCTGGACAAGAGATTG
AATTGTGTCACATGTTCCCTTGATTGTTGCGCTGAACAGCGTACCTACGAAAATTC
TTCGGCCTCCTCTCGCAGCGCTTCTGCCAAATAAACAAGACTTTCATCGAACCGTT
CCAACAAATTTTCAAAGATACCTATTCACAACCTCACAGACTTGACGCCAATCGAT
45 TGAGAAACGTTAGCAAATTTCTTCGCGCATTTATTGTTACCGACGCCATCGGCTGG
GAAGTGCTCGATATCATGAAATTAACGAGGAAGACACCAACAGTTCCAGCAGGAT
TTTTATCAAGATTTTGTTCAGGAGTTGTCCGAATATATGGGATTAGCGAAGTTGA
50 ATAAAAGGCTAAAGGATGAAACTTTACAGGAATATTTTCGCGGGGCTATTTCCGAGG
GATAACCCGAAGAACACGCGTTTTCGCCATCAATTTTTTTCAGTTCGATCGGTTTAGG
AGGTCTAACGGACGAGTTGAGGGAGCACTTGAAAAACGTGCCAAAACATCTGGAAG
TGATGGCTTTGAAAGCAGATTCGAGCAGCTCTAGCAGCAGTAGCAGCAGTTCCAGT
55 AACGATTCAGCAGCAGTTTCAAGATTCTTCCGATGACGAGGGTTCCAGGAAGAAGAA
AACAAAAAATTTGAAAACCCCGGACAAAAGAAGAAACAGAAAGAAGATGAAAAC
CCAAAAGAAAAGCGAGGATAAACCGAGGAACAAACCAGACTATAGAGATAGGAGA
AACGACGACAGGGAAAAGTTTAAAAAATACAGAAACAACGACGAAGAAAGCCACAG
60 AAGAAGCAGAGAAGATGCAAGAGAAAAATACAGAGGTCACGAGGAAAGAAGACGAG
GCCGAGAAGACCAAACGCGAAGAGGACAAGACCAAGTTCCAAGTTTTGTGC

La SEQ ID NO:87 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido NCM de *Meligethes aeneus* codificado por un ADN ilustrativo *Meligethes aeneus ncm*:

65

ES 2 811 279 T3

5 MTTDSEKRGSPATAAPRRSASKSPEPKKAKYDKKEKGDKDRKRRSHRSRSRDRDH
RDKHGGKKRYHDLDDPSEDYPRYYGEDRKQNSDRYWSKYPPKDRDEYVIGSRYYDV
EEKKEKKEKEDENKDKSVITPRERKTVDLLTSRTGGAYIPPAKLMMQAEITDKSS
10 AAYQRIAWALKKSIHGYINKINTSNIGLIARELLHENIVRGRGLLCKSI IQAQAA
SPTFTNVYAALVAVINSKFPNIGELLLKRLVLQFKRQNNKSIKISAAATFVAHL
VNQRVAHEILALEILTLVLESPTDDSVVAISFLKESGQKLEVSSEKGINAIFEML
RNILHEGQLEKRIQYMIEVMFQVRKDGFKDHAADVTEELDIVEEEDQFTHLITLDDV
15 KQANSEDI LN VF K FDDKYEENEGKYKTLSEILQSDSESGESGSEGSSEEDSEDEEG
EEDETKNQTIIDNTEINLITLRRTIYLTIQSSLDFECAHKLKMEIKPGQEI ELC
HMF LDCCAEQRTYEKFFGLLSQRFCQINKTFIEPFQQIFKDTYSTHRLDANRLRN
VSKFFAHLLEFTDAIGWEVLDIMKLNEDTNSSSRIFIKILFQELSEYMGLAKLNKR
20 LKDETLQEYFAGLFPDNPKNTRFAINFFTSIGLGGLTDELREHLKNVPKHLEVMA
LKADSSSSSSSSSSSSSSNDSSSSSDSSDDEGSRKKKTKKLKTPDKKKKQKEDEKPKK
KSEDKPRNKPDIRDRRNDREKFKKYRNNDDESHRRSREDAREKYRGHEERRRGRE
DQTRRGQDQVPRFV

La SEQ ID NO:88 muestra un c6ntigo que comprende un ADN ilustrativo *Meligethes aeneus ncm*:

25 AAATGTAGTCACTACCATTGTAGTGTTATTCGTTTCTTGTGCTTATTTTTAATTAA
CCAGTCAATTCGTGTGGTGTAGTGAACAAAGTTATAGTTATGACGACGGATTCCG
AGAGAGGTTCCCCTACAGCTGCGGCTCCACGCAGAAGCGCCTCGAAATCGCCAGAA
30 CCAAAAAAAGCAAAGTACGATAAGAAAGAGAAGGGCGATAAAGATCGCAAGAGGAG
ATCCCACAGATCCAGATCTAGATCCAGGGATAGAGACCATAGGGACAAACATGGTG
GAAAAAACGTTACCACGACCTGGACGACCCTTCTGAAGACTACCCAAGATATTAT
GGCGAGGATAGAAAACAGAACAGTGACAGATATTGGTCCAAGTACCCAAGAAAG

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 811 279 T3

ACAGGGACGAATATGTTATTGGTAACCGGTATTATGATGTTGAGGAAAAGAAGGAG
AAAAAGGAAAAAGAGGATGAAAATAAGGATAAATCCGTCATTACTCCAAGGGAAAG
GAAAACAGTGGACTTACTAACATCTCGAACAGGTGGGGCTTATATACTCCAGCTA
5 AATTACGTATGATGCAGGCTGAGATAACTGATAAATCATCAGCTGCATATCAAAGA
ATTGCCTGGGAAGCTTTAAAAAAGTCCATTCATGGTTACATCAACAAAATTAACAC
TTCCAATATTGGTCTTATTGCTAGAGAATTACTGCATGAAAACATTGTAAGAGGTA
10 GAGGTTTGCTGTGTAATCTATAATAACAAGCACAGGCAGCTTCCCCGACGTTCCACC
AATGTTTATGCAGCTTTAGTTGCAGTCATAAATTCAAATTCCCCAACATTGGAGA
ACTGTTACTGAAAAGGTTGGTTTTGCAGTTTAAAAGGGGTTTCAAGCAGAACAACA
AGTCTATCTGTATATCGGCTGCTACCTTTGTCGCGCATTTAGTAAACCAAAGAGTG
15 GCTCATGAAAATTTAGCATTGGAAATCTTACTTTACTTGTGAGTCCCCACAGA
TGATTCAGTAGAAGTGAGCAGAACAACAAGTCTATCTGTATATCGGCTGCTACCTT
TGTCGCGCATTTAGTAAACCAAAGAGTGGCCACGAAATTTTAGCATTGGAAATTC
TTACTTTACTTGTGAGTCCCCACAGATGATTCAGTGGAAGTAGCAATTTTCGTTT
20 TTGAAGGAAAGTGGTCAAAAACACTGAGGTGTCGAGTAAAGGTATCAATGCCAT
ATTTGAGATGTTGAGGAATATTCTGCATGAAGGACAGTTGGAGAAGAGAATACAGT
ACATGATTGAAGTCATGTTCCAAGTTCGGAAAGATGTTTTCAAGGATCATGCTGCT
GTTACTGAAGAACTAGATATTGTTGAAGAGGAAGATCAGTTTACTCACCTAATCAC
25 ATTTGATGATGTTAAACAAGCTAACTCAGAGGATATATTGAATGTGTTAAATTTG
ATGATAAATATGAGGAAAATGAGGGTAAATACAAAACTTTAAAGTAAGGAAATTCCTC
CAGTCAGACAGTGAATCAGGCGAATCTGGTTCAGAGGGGTCTGAAGAAGACTCGGA
AGATGAAGAAGGTGAAGAAGATGAAACCAAAAATCAAACCATTATTGATAACACAG
30 AAATAATTTAATCACCTTAAGGAGAACCATCTATCTCACAATACAATCCAGTTTG
GATTTTGAGGAATGTGCCATAAATTGATGAAAATGGAGATCAAACCTGGACAAGA
GATTGAATTGTGTCACATGTTCCCTTGATTGTTGCGCTGAACAGCGTACCTACGAAA
AATTCCTCGGCCTCCTCTCGCAGCGCTTCTGCCAAATAACAAGACTTTCATCGAA
35 CCGTTCACAAATTTTCAAAGATACCTATTCCACAACCTCACAGACTTGACGCCAA
TCGATTGAGAAACGTTAGCAAATTCCTCGCGCATTATTGTTACCGACGCCATCG
GCTGGGAAGTGCTCGATATCATGAAATTAACGAGGAAGACACCAACAGTTCCAGC
AGGATTTTCATCAAGATTTTGTTCAGGAGTTGTCCGAATATATGGGATTAGCGAA
40 GTTGAATAAAAGGCTAAAGGATGAAACTTTACAGGAATATTTTCGCGGGGCTATTTTC
CGAGGGATAACCCGAAGAACACGCGTTTTGCCATCAATTTTTTTCACGTCGATCGGT
TTAGGAGGTCTAACGGACGAGTTGAGGGAGCACTTGAAAAACGTGCCAAAACATCT
45 GGAAGTGATGGCTTTGAAAGCAGATTCGAGCAGCTCTAGCAGCAGTAGCAGCAGTT
CCAGTAACGATTCCAGCAGCAGTTTCCAGATTCTTCCGATGACGAGGGTTCCAGGAAG
AAGAAAACAAAAAATTGAAAACCCCGGACAAAAGAAGAAACAGAAAGAAGATGA
AAAACCCAAAAAGAAAAGCGAGGATAAACCGAGGAACAAAGTAAATGGTGATAAGA
50 ATATAGAAACAGAAGATACACAAGGAGTTGAGGACACAAAAAAGACTG

La SEQ ID NO:89 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido NCM de *Meligethes aeneus* codificado por un ADN ilustrativo *Meligethes aeneus ncm*:

MLRNILHEGQLEKRIQYMI EVMFQVRKDGFKDHA AVTEELDIVEEEDQFTHLITL
55 DDVKQANSEDI LN VF KFD D KYEENE GKYK T L SKEI L QSDSESGESGSEGSEEDSE
DEEGEEDETKNQTI IDNTE TNLITLRRTIYLTIQSSLD FE ECAHKLMKMEIKPGQ
EIELCHMFLDCCAEQR TYEKFFGLLSQRFCQINKTFIEPFQQIFKDTYSTTHRLD
60 ANRLRNVS KFFAHL LFTDAIGWEVLDIMKLN EEDTNSSSRIFIKILFQELSEYMG
LAKLNKRLKDETLQEYFAGLFPRDNPKNTRFAINFFTSIGLGLTDELREHLKNV
PKHLEVMALKADSSSSSSSSSSSSNDSSSSSDSSDDEGSRKKKTKKLTDPDKKK
70 QKEDEKPKKKS EDKPRNKVNGDKNIETEDTQGVEDTKKT

ES 2 811 279 T3

La SEQ ID NO:90 muestra un ADN ilustrativo *Meligethes aeneus ncm*, referido en la presente descripción en algunos lugares como *ncm* reg1 (región 1), que se usa en algunos ejemplos para la producción de un ARNs:

5 GTTCCTTGATTGTTGCGCTGAACAGCGTACCTACGAAAAATTCTTCGGCCTCCTCT
CGCAGCGCTTCTGCCAAATAAACAAGACTTTCATCGAACCGTTCCAACAAATTTTC
AAAGATACCTATTCCACAACCTCACAGACTTGACGCCAATCGATTGAGAAACGTTAG
10 CAAATTCTTCGCGCATTATTGTTTCACCGACGCCATCGGCTGGGAAGTGCTCGATA
TCATGAAATTAAACGAGGAAGACACCAACAGTTCCAGCAGGATTTTCATCAAGATT
TTGTTCCAGGAGTTGTCCGAATATATGGGATTAGCGAAGTTGAATAAAAGGCTAAA
GGATGAAACTTTACAGGAATATTTTCGCGGGGCTATTTCCGAGGGATAACCCGAAGA
15 ACACGCGTTTTCGCCATCAATTTTTTTCACGTGATCGGTTTAGGAGGTCTAACGGAC
GAGTTGAGGGAGCACTTGAAAAACGTGCCAAAACATCTGGA

Las SEQ ID NOs: 91-92 muestran cebadores usados para amplificar porciones de una secuencia *Meligethes aeneus ncm* que comprende *ncm* reg1.

La SEQ ID NO:93 muestra un cóntigo que comprende un ADN ilustrativo *Meligethes aeneus ncm*:

20 TTTTTGTTACCAACCAAACGGCCTAAATTTCCCTAGATAACCTAAAATAAAAACAA
CACTTCGTCAATTTGTGTAAATTTCAAACAAATGTAGTCACTACCATTGTAGTGTTAT
TCGTTTCTTGCTTATTTTTTAATTAACCAGTCAATTCGTGTGGTGTAGTGAACAA
25 AGGTTATAGTTATGACGACGGATTCCGAGAGAGGTTCCCCTACAGCTGCGGCTCCA
CGCAGAAGCGCCTCGAAATCGCCAGAACCAAAAAAGCAAAGTACGATAAGAAAGA
GAAGGGCGATAAAGATCGCAAGAGGAGATCCCACAGATCCAGATCTAGATCCAGGG
30 ATAGAGACCATAGGGACAAACATGGTGGAAAAAACGTTACCACGACCTGGACGAC
CCTTCTGAAGACTACCCAAGATATTATGGCGAGGATAGAAAACAGAACAGTGACAG
ATATTGGTCCAAGTACCCAAGAAAGACAGGGACGAATATGTTATTGGTAGCCGGT
ATTATGATGTTGAGGAAAAGAAGGAGAAAAGGAAAAGAGGATGAAAATAAGGAT

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 811 279 T3

AAATCCGTCATTACTCCAAGGGAAAGGAAAACAGTGGACTTACTAACATCTCGAAC
AGGTGGGGCTTATATACCTCCAGCTAAATTACGTATGATGCAGGCTGAGATAACTG
ATAAATCATCAGCTGCATATCAAAGAATTGCCTGGGAAGCTTTAAAAAAGTCCATT
5 CATGGTTACATCAACAAAATTAACACTTCCAATATTGGTCTTATTGCTAGAGAATT
ACTGCATGAAAACATTGTAAGAGGTAGAGGTTTGTCTGTGTAATCTATAATAACAAG
CACAGGCAGCTTCCCCGACATTACCAATGTTTATGCAGCTTTAGTTGCAGTCATA
AATTCAAATTTCCCAACATTGGAGAAGTGTACTGAAAAGGTTGGTTTTGCAGTT
10 TAAAAGGGTTTCAAGCAGAACAACAAGTCTATCTGTATATCGGCTGCTACCTTTG
TCGCGCATTTAGTAAACCAAAGAGTGGCCCATGAAATTTTAGCATTGGAAATCTTT
ACTTTACTTGTGTGAGTCCCCACAGATGATTCAGTGGAAAGTAGCAATTTTCGTTTTT
GAAGGAAAGTGGTCAAAAACACTGAGGTGTTCGAGTAAAGGTATCAATGCCATAT
15 TTGAGATGTTGAGGAATATTCTGCATGAAGGACAGTTGGAGAAGAGAATACAGTAC
ATGATTGAAGTCATGTTCCAAGTTCGAAAGATGGTTTCAAGGATCATGCTGCTGT
TACTGAAGAACTAGATATTGTTGAAGAGGAAGATCAGTTTACTCACCTAATCACAT
20 TGGATGATGTTAAACAAGCTAACTCAGAGGATATATTGAATGTGTTTAAATTTGAT
GATAAATATGAGGAAAATGAGGGTAAATACAAAACCTTAAAGTAAGGAAATCTCCA
GTCAGACAGTGAATCAGGCGAATCTGGTTCAGAGGGGTCTGAAGAAGACTCGGAAG
ATGAAGAAGGTGAAGAAGATGAAACCAAAAATCAAACCATTATTGATAACACAGAA
25 ACTAATTTAATCACCTTAAGGAGAACCATCTATCTCACAATACAATCCAGTTTGG
TTTTGAGGAATGTGCCATAAATTGATGAAAATGGAGATCAAACCTGGACAAGAGA
TTGAATTGTGTCACATGTTTCTTGATTGTTGCGCTGAACAGCGTACCTACGAAAAA
TTCTTCGGCTCCTCTCGCAGCGCTTCTGCCAATAAACAAGACTTTCATCGAACC
30 GTTCCAACAAATTTTCAAAGATACCTATTCCACAACCTCACAGACTTGACGCCAATC
GATTGAGAAACGTTAGCAAATTTCTCGCGCATTTATTGTTACCGACGCCATCGGC
TGGGAAGTGCTCGATATCATGAAATTAACGAGGAAGACACCAACAGTTCCAGCAG
GATTTTCATCAAGATTTTGTTCAGGAGTTGTCCGAATATATGGGATTAGCGAAGT
35 TGAATAAAAGGCTAAAGGATGAAACTTTACAGGAATATTTTCGCGGGGCTATTTCCG
AGGGATAACCCGAAGAACACGCGTTTCGCCATCAATTTTTTTCACGTCGATCGGTTT
AGGAGGTCTAACGGACGAGTTGAGGGAGCACTTGAAAAACGTGCCAAAACATCTGG
AAGTGATGGCTTTGAAAGCAGATTCGAGCAGCTCTAGCAGCAGTAGCAGCAGTTCC
40 AGTAACGATTCCAGCAGCAGTTTCCAGATTCTTCCGATGACGAGGGTTCCAGGAAGAA
GAAAACAAAAAATTGAAAACCCCGGACAAAAGAAGAAACAGAAAGAAGATGAAA
AACCACAAAAGAAAAGCGAGGATAAACCGAGGAACAAACCAGACTATAGAGATAGA
45 AGAAACGACGACAGGGAAAAGTTTAAAAAATACAGAAACAACGACGAAGAAAGCCA
CAGAAGAAGCAGAGAAGATGCAAGAGAAAAATACAGAGGTCACGAGGAAAGAAGAA
GCGACCACAGAGAAGAATACCGGCCGAGAGAACATAGAGGTAGAGATAGACGTTAG
50 TTGTATAATAATGTATATTTTTT

La SEQ ID NO:94 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido NCM de *Meligethes aeneus* codificado por un ADN ilustrativo *Meligethes aeneus ncm*:

55

60

65

5 MTTDSERGSPTAAAPRRSASKSPEPKKAKYDKKEKGDKDRKRRSHRSRSRDRDH
 RDKHGGKKRYHDLDDPSEDYPRYYGEDRKQNSDRYWSKYPKKDRDEYVIGSRYYDV
 EEKKEKKEKEDENKDKSVITPREKTVDLLTSRTGGAYIPPAKLRMMQAEITDKSS
 10 AAYQRIAWALKKSIHGYINKINTSNIGLIARELLHENIVRGRGLLCKSI IQAQAA
 SPTFTNVYAALVAVINSKFPNIGELLLKRLVLQFKRGFKQNNKSI CISAATFVAHL
 VNQRVAHEILALEILTLVLESPTDDSEVAISFLKESGQKLETVSSKGINAIFEML
 RNILHEGQLEKRIQYMIEVMFQVRKDGFKDHAAVTEELDIVEEEDQFTHLITLDDV
 15 KQANSEDILNVFKFDDKYEENEGKYKTLSEILQSDSESGESGSEGSSEEDSEDEEG
 EEDETKNQTIIDNTEENLITLRTIYLTIQSSLDFECAHKLMKMEIKPGQEI ELC
 HMF LDCCAEQRTYEKFFGLLSQRFCQINKTFIEPFQQIFKDTYSTTHRLDANRLRN
 VSKFFAHLLEFTAIGWEVLDIMKLNEDTNSSSRIFIKILFQELSEYMGLAKLNKR
 20 LKDETLQEYFAGLFPNDPNKTRFAINFFTSIGLGGLTDELREHLKNVPKHLEVMA
 LKADSSSSSSSSSSSSSSNDSSSSSDSSDDEGSRKKKTKKLKTPDKKKKQKEDEKPKK
 KSEDKPRNKPDYRDRRNDREKFKKYRNNDDESHRRSREDAREKYRGHEERRSDHR
 EEYRPREHRGRDRR

Las SEQ ID NOs: 95-99 muestran ARN ilustrativos transcritos a partir de ácidos nucleicos que comprenden polinucleótidos ilustrativos de *Meligethes ncm* y fragmentos de estos.

25 Descripción detallada

1. Visión general de diversas modalidades

30 Desarrollamos la interferencia de ARN (ARNi) como una herramienta para el manejo de plagas de insectos, mediante el uso de una de las especies de plagas objetivo más probables para plantas transgénicas que expresan ARNs; el gusano de la raíz del maíz occidental. Hasta ahora, la mayoría de los genes propuestos como objetivos para el ARNi en las larvas de gusanos de la raíz no logran realmente su propósito. En la presente descripción, describimos la eliminación mediada por ARNi *nucampholin* (*ncm*) en la plaga de insectos ilustrativos, el gusano de la raíz del maíz occidental, que se muestra que tiene un fenotipo letal cuando, por ejemplo, el iARN son moléculas suministradas a través de ARNs *ncm* ingerido.
 35 En modalidades en la presente descripción, la capacidad de suministrar ARNs *ncm* al alimentar a los insectos le confiere un efecto ARNi que es muy útil para el manejo de plagas de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). Mediante la combinación de ARNi mediado por *ncm* con otros objetivos de ARNi útiles (*por ejemplo*, objetivos de ARNi *ROP*, como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 14/577,811; objetivos de ARNi *RNAPII140*, como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 14/577,854; objetivos de ARNi *Dre4*, como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 14/705,807; objetivos de ARNi *COP1 alfa*, como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/063,199; objetivos de ARNi *COP1 beta*, como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/063,203; objetivos de ARNi *COP1 gamma*, como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/063,192; objetivos de ARNi *COP1 delta*, como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/063,216) el potencial de afectar múltiples secuencias objetivo, por ejemplo, en coleópteros (*por ejemplo*, gusanos de la raíz larvarios), pueden aumentar las oportunidades para desarrollar enfoques sostenibles para el manejo de plagas de insectos con tecnologías de ARNi.

50 En la presente descripción se describen métodos y composiciones para el control genético de infestaciones de plagas de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). También se proporcionan métodos para identificar uno o más genes esenciales para el ciclo de vida de una plaga de insectos para uso como gen objetivo para el control mediado por ARNi de una población de plagas de insectos. Los vectores plasmídicos de ADN que codifican una molécula de ARN pueden diseñarse para suprimir uno o más genes objetivos esenciales para el crecimiento, la supervivencia y/o el desarrollo. En algunos aspectos de la descripción, la molécula de ARN puede ser capaz de formar moléculas de ARNs. En algunas modalidades, se proporcionan métodos para la represión postranscripcional de la expresión o la inhibición de un gen objetivo a través de moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una secuencia codificante o no codificante del gen objetivo en una plaga de insectos. En estas y otras modalidades, una plaga puede ingerir una o más moléculas de hpARN transcritas a partir de toda o una porción de una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia codificante o no codificante de un gen objetivo, lo que proporciona de esta manera un efecto protector de la planta.

60 Por lo tanto, algunas modalidades implican la inhibición específica de secuencia de la expresión de productos génicos objetivo, mediante el uso de hpARN que es complementario a las secuencias codificantes y/o no codificantes del (de los) gen(es) objetivo para lograr al menos un control parcial de una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). Se describe un conjunto de moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas que comprenden un polinucleótido, por ejemplo, como se establece en una de las SEQ ID NOs: 1; 77; 84; 86; 88 y 93, y fragmentos de estos. En algunas modalidades, una molécula de ARNs estabilizada puede expresarse a partir de estos polinucleótidos, fragmentos de estos, o un gen que comprende uno de estos polinucleótidos, para el silenciamiento o inhibición postranscripcional de un gen objetivo. En

ciertas modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de cualquiera de las SEQ ID NOs: 84; 86; 88 y 93.

5 Algunas modalidades implican una célula huésped recombinante (*por ejemplo*, una célula vegetal) que tiene en su genoma al menos un ADN recombinante que codifica al menos una molécula de iARN (*por ejemplo*, ARNs). En modalidades particulares, la(s) molécula(s) de ARNs pueden proporcionarse cuando se ingieren por una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero) para silenciar o inhibir postranscripcionalmente la expresión de un gen objetivo en la plaga. El ADN recombinante puede comprender, por ejemplo, fragmentos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 84, 86, 88 y 93; y un polinucleótido que consiste de una secuencia parcial de un gen que comprende uno de las SEQ ID NOs: 84, 86, 88 y 93, y/o complementos de estos.

15 Algunos aspectos de la descripción implican una célula huésped recombinante que tiene en su genoma un ADN recombinante que codifica al menos una molécula de iARN (*por ejemplo*, ARNs) que comprende todo o parte de la SEC ID NO: 78 o SEC ID NO: 83 (*por ejemplo*, al menos un polinucleótido seleccionado de un grupo que comprende las SEQ ID NOs: 78-83). Algunos aspectos de la descripción implican una célula huésped recombinante que tiene en su genoma un ADN recombinante que codifica al menos una molécula de iARN (*por ejemplo*, ARNs) que comprende todo o parte de cualquiera de las SEQ ID NOs: 95-97 y 99 (*por ejemplo*, SEQ ID NO:98). Cuando se ingiere por una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero), la(s) molécula(s) de iARN pueden silenciar o inhibir la expresión de un ADN objetivo *ncm* (*por ejemplo*, un ADN que comprende todo o parte de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1; 3-6; 77, 84, 86, 88, 90 y 93) en la plaga y, de esta manera, resultan en el cese del crecimiento, el desarrollo y/o la alimentación en la plaga.

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

35 Algunas modalidades implican un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). En estas y otras modalidades, se puede proporcionar una molécula de ácido nucleico, en donde la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNs. En modalidades, un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNs está unida operativamente a un promotor, y también puede estar unido operativamente a una secuencia de terminación de la transcripción. En modalidades particulares, un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de plaga de insectos puede comprender: (a) transformar una célula vegetal con un vector que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNs; (b) cultivar la célula vegetal transformada en condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo celular vegetal que comprenda una pluralidad de células vegetales transformadas; (c) seleccionar una célula vegetal transformada que ha integrado el vector en su genoma; y (d) determinar que la célula vegetal transformada seleccionada comprende la molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNs codificada por el polinucleótido del vector. Una planta puede regenerarse a partir de una célula vegetal que tiene el vector integrado en su genoma y comprende la molécula de ARNs codificada por el polinucleótido del vector.

50 Por lo tanto, también se describe una planta transgénica que comprende un vector que tiene un polinucleótido que codifica una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNs integrada en su genoma, en donde la planta transgénica comprende la molécula de ARNs codificada por el polinucleótido del vector. En modalidades particulares, la expresión de una molécula de ARN capaz de formar una molécula de ARNs en la planta es suficiente para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero) que contacta la planta transformada o la célula vegetal (*por ejemplo*, al alimentarse de la planta transformada, una parte de la planta (*por ejemplo*, raíz) o célula vegetal), de manera que se inhibe el crecimiento y/o supervivencia de la plaga. Las plantas transgénicas descritas en la presente descripción pueden mostrar resistencia y/o tolerancia mejorada a las infestaciones de plaga de insectos. Las plantas transgénicas particulares pueden mostrar resistencia y/o tolerancia mejorada a una o más plagas de coleópteros seleccionados del grupo que consiste en: WCR; NCR SCR; MCR; *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. speciosa* Germar *D. u. undecimpunctata* Mannerheim y *Meligethes aeneus*.

60 También se describen en la presente descripción métodos para el suministro de agentes de control, tales como una molécula de iARN, a una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). Dichos agentes de control pueden causar, directa o indirectamente, un deterioro en la capacidad de una población de plaga de insectos para alimentarse, crecer o de cualquier otra manera, causar daños en un huésped. En algunas modalidades, se proporciona un método que comprende el suministro de una molécula de ARNs estabilizada a una plaga de insectos para suprimir al menos un gen objetivo en la plaga, lo que causa, de esta manera, ARNi y reduce o elimina el daño de la planta en un huésped de plaga. En algunas

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

5 En algunos aspectos de la descripción, se proporcionan composiciones (*por ejemplo*, una composición tópica) que comprenden una molécula de iARN (*por ejemplo*, ARNds) para usar en plantas, animales y/o el ambiente de una planta o animal para lograr la eliminación o reducción de una infestación de plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). En aspectos particulares de la descripción, la composición puede ser una composición nutricional o una fuente de alimento para alimentar a la plaga de insectos. Algunos aspectos de la descripción comprenden hacer la composición nutricional o fuente de alimento disponible para la plaga. La ingestión de una composición que comprende moléculas de iARN puede resultar en la absorción de las moléculas por una o más células de la plaga, lo que a su vez puede resultar en la inhibición de la expresión de al menos un gen objetivo en la(s) célula(s) de la plaga. La ingestión o daño a una planta o célula vegetal por una infestación de plaga de insectos puede limitarse o eliminarse en o sobre cualquier tejido o entorno del huésped en el que esté presente la plaga al proporcionar una o más composiciones que comprenden una molécula de iARN en el huésped de la plaga.

15 Los cebos de ARNi se forman cuando el ARNds se mezcla con alimentos o un atrayente o ambos. Cuando las plagas ingieren el cebo, también consumen el ARNds. Los cebos pueden tomar la forma de gránulos, geles, polvos fluidos, líquidos o sólidos. En otra modalidad, *ncm* puede incorporarse a una formulación de cebo tal como la descrita en la patente de Estados Unidos No. 8,530,440 que se incorpora aquí por referencia. Generalmente, con cebos, los cebos se colocan en o alrededor del entorno de la plaga de insectos, por ejemplo, el WCR puede entrar en contacto con el cebo, y/o sentirse atraído hacia él.

25 Las composiciones y métodos descritos en la presente descripción pueden usarse juntos en combinaciones con otros métodos y composiciones para controlar el daño por plagas de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). Por ejemplo, una molécula de iARN como se describe en la presente descripción para proteger a las plantas de las plagas de insectos puede usarse en un método que comprende el uso adicional de uno o más agentes químicos efectivos contra una plaga de insectos, biopesticidas efectivos contra dicha plaga, rotación de cultivos, 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 perjudiciales para una plaga de insectos (*por ejemplo*, toxinasBt)).

II. Abreviaturas

35	ARNds	ácido ribonucleico bicatenario
	GI	inhibición del crecimiento
	NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
	ADNg	ácido desoxirribonucleico genómico
	iARN	ácido ribonucleico inhibitorio
	ORF	marco de lectura abierto
40	ARNi	interferencia de ácido ribonucleico
	miARN	ácido micro ribonucleico
	shARN	ácido ribonucleico de horquilla corta
	siARN	ácido ribonucleico inhibitorio pequeño
	hpARN	ácido ribonucleico de horquilla
45	UTR	región no traducida
	WCR	gusano de la raíz del maíz occidental (<i>Diabrotica virgifera</i> LeConte)
	NCR	gusano de la raíz del maíz del norte (<i>Diabrotica barberi</i> Smith y Lawrence)
	MCR	Gusano de la raíz del maíz mexicano (<i>Diabrotica virgifera zea</i> Kryan y Smith)
	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
50	qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
	RISC	complejo de silenciamiento inducido por ARN
	SCR	gusano de la raíz del maíz del sur (<i>Diabrotica undecimpunctata</i> Howardi Barber)
	YFP	proteína fluorescente amarilla
	EEM	error estándar de la media
55	PB	escarabajo del polen (<i>Meligethes aeneus</i> Fabricius)

III. Términos

60 En la siguiente descripción y tablas que siguen, se usan una serie de términos. Con el objetivo de proporcionar una comprensión clara y consistente de la especificación y reivindicaciones, que incluyen el alcance que debe darse a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones:

65 Plaga de coleópteros: Como se usa en la presente descripción, el término "plaga de coleópteros" se refiere a los insectos plagas del orden Coleoptera, incluidos los insectos plagas del género *Diabrotica*, que se alimentan de cultivos agrícolas y productos agrícolas, incluidos el maíz y otros pastos verdaderos. En ejemplos particulares, una plaga de coleópteros se selecciona de una lista que comprende *D. v. virgifera* LeConte (WCR); *D. barberi* Smith y Lawrence (NCR); *D. u. howardi*

(SCR); *D. v. zea* (MCR); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. speciosa* Germar; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; y *Meligethes aeneus* Fabricius.

5 Contacto (con un organismo): Como se usa en la presente descripción, el término "contacto con" o "absorción por" un organismo (*por ejemplo*, un coleóptero), 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 la alimentación); contacto del organismo con una composición que comprende la molécula de ácido nucleico; y remojo de organismos con una solución que comprende la molécula de ácido nucleico.

10 Cántigo: Como se usa en la presente descripción, el término "cántigo" se refiere a una secuencia de ADN que se reconstruye a partir de un conjunto de segmentos de ADN solapados derivados de una sola fuente genética.

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

20 Expresión: Como se usa en la presente descripción, la "expresión" de un polinucleótido codificante (por ejemplo, un gen o un transgen) se refiere al proceso mediante el cual la información codificada de una unidad transcripcional de ácido nucleico (que incluye, *por ejemplo*, ADN_g o ADN_c) se convierte en una parte operativa, no operativa, o estructural de una célula, lo que incluye con frecuencia la síntesis de una proteína. La expresión génica puede estar influenciada por señales externas; por ejemplo, la exposición de una célula, tejido u organismo a un agente que aumenta o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen también puede regularse en cualquier parte de la trayectoria del ADN al ARN a la proteína. La regulación de la expresión génica se produce, por ejemplo, a través de controles que actúan en la transcripción, la traducción, el transporte y el procesamiento del ARN, la degradación de moléculas intermediarias tales como ARNm, o a través de la activación, inactivación, compartimentación o degradación de moléculas de proteínas específicas luego de su elaboración, o mediante combinaciones de estas. La expresión génica puede medirse a nivel de ARN o a nivel de proteína mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, sin limitación, Northern blot, RT-PCR, Western blot o ensayo(s) de actividad proteica *in vitro*, *in situ* *in vivo*.

30 Material genético: Como se usa en la presente descripción, el término "material genético" incluye todos los genes y moléculas de ácido nucleico, tales como ADN y ARN.

35 Inhibición: Como se usa en la presente descripción, el término "inhibición", cuando se usa para describir un efecto sobre un polinucleótido codificante (por ejemplo, un gen), se refiere a una disminución medible en el nivel celular de ARNm transcrito desde el polinucleótido codificante y/o péptido, polipéptido, o producto proteico del polinucleótido codificante. En algunos ejemplos, la expresión de un polinucleótido codificante puede inhibirse de manera que la expresión aproximadamente se elimine. "Inhibición específica" se refiere a la inhibición de un polinucleótido codificante objetivo sin afectar consecuentemente la expresión de otros polinucleótidos codificantes (*por ejemplo*, genes) en la célula en donde se realiza la inhibición específica.

40 Insecto: Como se usa en la presente descripción con respecto a las plagas, el término "plaga de insectos" incluye específicamente las plagas de insectos coleópteros.

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

55 Molécula de ácido nucleico: Como se usa en la presente descripción, el término "molécula de ácido nucleico" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos, que puede incluir tanto cadenas antisentido como sentido de ARN, ADN_c, ADN_g y formas sintéticas y polímeros mixtos de los anteriores. Un nucleótido o nucleobase puede referirse a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una "molécula de ácido nucleico" como se usa en la presente descripción, es sinónimo de "ácido nucleico" y "polinucleótido." Una molécula de ácido nucleico usualmente tiene al menos 10 bases de longitud, a menos que de cualquier otra manera se especifique. 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 molécula de ácido nucleico se refiere a un polinucleótido que tiene nucleobases que pueden formar pares de bases con las nucleobases de la molécula de ácido nucleico (*es decir*, A-T/U y G-C).

65 Algunas modalidades incluyen ácidos nucleicos que comprenden un ADN molde que se transcribe en una molécula de ARN que es el complemento de una molécula de ARNm. En estas modalidades, el complemento del ácido nucleico transcrito en la molécula de ARNm está presente en la orientación 5' a 3', de manera que la ARN polimerasa (que transcribe el ADN en la dirección 5' a 3') transcribirá un ácido nucleico a partir del complemento que puede hibridarse con

la molécula de ARNm. A menos que se establezca explícitamente de cualquier otra manera, o esté claro ser de cualquier otra manera a partir del contexto, el término "complemento" se refiere, por lo tanto, a un polinucleótido que tiene nucleobases, de 5' a 3', que pueden formar pares de bases con las nucleobases de un ácido nucleico de referencia. De manera similar, a menos que se establezca explícitamente ser de cualquier otra manera (o esté claro ser de cualquier otra manera a partir del contexto), el "complemento inverso" de un ácido nucleico se refiere al complemento en orientación inversa. Lo anterior se demuestra en la siguiente ilustración:

5	ATGATGATG	polinucleótido
	TACTACTAC	"complemento" del polinucleótido
10	CATCATCAT	"complemento inverso" del polinucleótido

Las modalidades de la invención se refieren a moléculas de ARNi formadoras de ARN en horquilla. En estas moléculas de ARNi, el complemento de un ácido nucleico que es marcado por la interferencia de ARN y el complemento inverso se pueden encontrar en la misma molécula, de manera que la molécula de ARN monocatenario puede "doblar" e hibridarse a sí misma sobre la región que comprende los polinucleótidos complementarios y complementarios inversos.

"Moléculas de ácido nucleico" incluyen todos los polinucleótidos, por ejemplo: formas de ADN monocatenario y bicatenario; formas monocatenarias de ARN; y formas bicatenarias de ARN (ARNds). El término "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere tanto a las cadenas sentido y antisentido de un ácido nucleico como a cadenas solas o en el dúplex. El término "ácido ribonucleico" (ARN) incluye iARN (ARN inhibitorio), ARNds (ARN bicatenario), siARN (ARN interferente pequeño), shARN (ARN en horquilla pequeño), ARNm (ARN mensajero), miARN (micro-ARN), hpARN (ARN en horquilla), ARNt (ARN de transferencia, ya sea cargado o descargado con un aminoácido acilado correspondiente) y ARNc (ARN complementario). El término "ácido desoxirribonucleico" (ADN) incluye ADNc, ADNg e híbridos de ADN-ARN. Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" y "fragmentos" de estos serán entendidos por los expertos en la técnica como un término que incluye ADNg, ARN ribosómico, ARN de transferencia, ARN mensajero, operones y polinucleótidos ingenierizados más pequeños que codifican o puede adaptarse para codificar, péptidos, polipéptidos o proteínas.

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

40 Una molécula de ácido nucleico puede incluir cualquiera o ambos nucleótidos naturales y modificados unidos entre sí por enlaces nucleotídicos naturales y/o no naturales. Las moléculas de ácido nucleico pueden modificarse química o bioquímicamente, o pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones entre nucleótidos (*por ejemplo*, enlaces sin carga: por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, *etc.*; enlaces con carga: por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, *etc.*; restos pendientes: por ejemplo, péptidos; intercaladores: por ejemplo, acridina, psoraleno, *etc.*; quelantes; alquilantes y enlaces modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, *etc.*). El término "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier conformación topológica, incluidas conformaciones monocatenarias, bicatenarias, parcialmente en forma de duplex, triplex, de horquilla, circulares y de candado.

50 Como se usa en la presente descripción con respecto al ADN, el término "polinucleótido codificante", "polinucleótido estructural" o "molécula de ácido nucleico estructural" se refiere a un polinucleótido que en última instancia se traduce a un polipéptido, a través de transcripción y ARNm, cuando se coloca bajo el control de elementos regulatorios adecuados. Con respecto al ARN, el término "polinucleótido codificante" se refiere a un polinucleótido que se traduce en un péptido, polipéptido o proteína. Los límites de un polinucleótido codificante están determinados por un codón de inicio de la traducción en el extremo 5' y un codón de parada de la traducción en el extremo 3'. Los polinucleótidos codificantes incluyen, pero no se limitan a: ADNg; ADNc; EST; y polinucleótidos recombinantes.

60 Como se usa en la presente descripción, "polinucleótido no codificante transcrito" se refiere a segmentos de moléculas de ARNm tales como 5'UTR, 3'UTR y segmentos de intrones que no se traducen en un péptido, polipéptido o proteína. Además, "polinucleótido no codificante transcrito" se refiere a un ácido nucleico que se transcribe en un ARN que funciona en la célula, por ejemplo, ARN estructurales (*por ejemplo*, ARN ribosómico (ARNr) como se ejemplifica por ARNr 5S, ARNr 5,8S, ARNr 16S, ARNr 18S, ARNr 23S y ARNr 28S, y similares); ARN de transferencia (ARNt); y snARN tales como U4, U5, U6 y similares. Los polinucleótidos no codificantes transcritos también incluyen, por ejemplo y sin limitación, ARN pequeños (sARN), término que a menudo se usa para describir pequeños ARN no codificantes bacterianos; ARN nucleolar pequeños (snoARN); microARN; ARN interferentes pequeños (siARN); ARN asociados a Piwi (piARN); y ARN largos no codificantes. Aún más, "polinucleótido no codificante transcrito" se refiere a un polinucleótido que puede existir de forma nativa como un "separador" intragénico en un ácido nucleico y que se transcribe en una molécula de ARN.

ARN de interferencia letal: Como se usa en la presente descripción, el término "ARN de interferencia letal" se refiere al ARN de interferencia que da como resultado la muerte o una reducción en la viabilidad del sujeto individual al que, por ejemplo, se suministra un ARNs, miARN, siARN, shARN y/o hpARN.

5 Genoma: Como se usa en la presente descripción, el término "genoma" se refiere al ADN cromosómico encontrado dentro del núcleo de una célula, y también se refiere al ADN de orgánulo encontrado dentro de los componentes subcelulares de la célula. En algunas modalidades de la invención, se puede introducir una molécula de ADN en una célula vegetal, de manera que la molécula de ADN se integre en el genoma de la célula vegetal. En estas y otras modalidades, la molécula de ADN puede integrarse en el ADN nuclear de la célula vegetal, o integrarse en el ADN del cloroplasto o en la mitocondria de la célula vegetal. El término "genoma," como se aplica a las bacterias, se refiere al cromosoma y a los plásmidos dentro de la célula bacteriana. En algunas modalidades de la invención, se puede introducir una molécula de ADN en una bacteria, de manera que la molécula de ADN se integre en el genoma de la bacteria. En estas y otras modalidades, la molécula de ADN puede estar integrada cromosómicamente o localizada como o en un plásmido estable.

15 Identidad de secuencia: Como se usa en la presente descripción, el término "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos polinucleótidos o polipéptidos, se refiere a los residuos en las secuencias de dos moléculas que son iguales cuando se alinean por correspondencia máxima en una ventana de comparación especificada.

20 Como se usa en la presente descripción, el término "porcentaje de identidad de secuencia" puede referirse al valor determinado por la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas (*por ejemplo*, secuencias de ácido nucleico o secuencias de polipéptidos) de una molécula sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (*es decir*, interrupciones) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula al determinar el número de posiciones en las que se presenta el residuo de nucleótido o aminoácido idéntico en ambas secuencias para rendir el número de posiciones coincidentes, dividir el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicar el resultado por 100 para rendir el porcentaje de identidad de secuencia. Se dice que una secuencia que es idéntica en cada posición en comparación con una secuencia de referencia es 100 % idéntica a la secuencia de referencia, y viceversa.

30 Los métodos para el alineamiento de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. Varios programas y algoritmos de alineamiento se describen en, por ejemplo: Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443; Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU 85:2444; Higgins y Sharp (1988) Gene 73:237-44; Higgins y Sharp (1989) CABIOS 5:151-3; Corpet y otros (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang y otros (1992) Comp. Appl. Biosci. 8:155-65; Pearson y otros (1994) Methods Mol. Biol. 24:307-31; Tatiana y otros (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-50. Puede encontrarse una consideración detallada de los métodos de alineamiento de secuencias y cálculos de homología en, *por ejemplo*, Altschul y otros (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10.

40 El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST™; Altschul y otros (1990)) está disponible a partir de varias fuentes, incluso en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Bethesda, MD), y en internet, para uso en relación con varios programas de análisis de secuencias. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia mediante el uso de este programa está disponible en internet en la sección de "ayuda" para BLAST™. Para las comparaciones de secuencias de ácido nucleico, puede emplearse la función "Blast 2 secuencias" del programa BLAST™ (Blastn) mediante el uso de la matriz BLOSUM62 predeterminada configurada con los parámetros predeterminados. Los ácidos nucleicos con una similitud de secuencia superior a las secuencias de los polinucleótidos de referencia mostrarán aumento del porcentaje de identidad cuando se evalúa mediante este método.

50 Específicamente hibridable/Específicamente complementario: Como se usa en la presente descripción, los términos "específicamente hibridable" y "específicamente complementario" son términos que indican un grado suficiente de complementariedad de manera que se produzca una unión específica y estable entre la molécula de ácido nucleico y una molécula de ácido nucleico objetivo. La hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico implica la formación de un alineamiento antiparalelo entre las nucleobases de las dos moléculas de ácido nucleico. Las dos moléculas son capaces de formar enlaces de hidrógeno con las bases correspondientes en la cadena opuesta para formar una molécula dúplex que, si es suficientemente estable, es detectable mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica. Un polinucleótido no necesita ser 100 % complementario a su ácido nucleico objetivo para ser específicamente hibridable. Sin embargo, la cantidad de complementariedad que debe existir para que la hibridación sea específica es una función de las condiciones de hibridación usadas.

60 Las condiciones de hibridación que resultan en grados particulares de rigurosidad variarán en dependencia de la naturaleza del método de hibridación de elección y la composición y longitud de los ácidos nucleicos de hibridación. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na⁺ y/o Mg⁺⁺) del tampón de hibridación determinará la rigurosidad de hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen en la rigurosidad. Los cálculos sobre las condiciones de hibridación que se necesitan para alcanzar grados particulares de rigurosidad son conocidos por los expertos en la técnica y se discuten, por ejemplo, en Sambrook y otros (ed.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, capítulos 9 y 11; y Hames y Higgins (eds.) Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, 1985. Las instrucciones y guías más detalladas con respecto a la hibridación de ácidos nucleicos pueden encontrarse, por ejemplo, en Tijssen, "Overview

of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," en Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2, Elsevier, NY, 1993; y Ausubel y otros, Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995.

5 Como se usa en la presente descripción, las "condiciones rigurosas" abarcan las condiciones bajo las cuales la hibridación solo ocurrirá si hay menos del 20 % de discordancia entre la secuencia de la molécula de hibridación y un polinucleótido homólogo dentro de la molécula de ácido nucleico objetivo. "Condiciones rigurosas" incluyen niveles particulares adicionales de rigurosidad. Por lo tanto, como se usa en la presente descripción, las condiciones de "rigurosidad moderada" son aquellas bajo las cuales las moléculas con más del 20 % de discordancia de secuencia no se hibridarán; las condiciones de "rigurosidad alta" son aquellas en las que las secuencias con más del 10 % de discordancia no se hibridarán; y las condiciones de "rigurosidad muy alta" son aquellas en las que las secuencias con más del 5 % de discordancia no se hibridarán.

15 Siguen a continuación condiciones de hibridación no limitantes y representativas.

Condición de rigurosidad alta (detecta polinucleótidos que comparten al menos 90 % de identidad de secuencia): Hibridación en tampón SSC 5x a 65 °C durante 16 horas; lavado dos veces en tampón SSC 2x a temperatura ambiente durante 15 minutos cada uno; y lavado dos veces en tampón SSC 0,5x a 65 °C durante 20 minutos cada uno.

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

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

30 Como se usa en la presente descripción, el término "sustancialmente homólogo" u "homología sustancial," con respecto a un ácido nucleico, se refiere a un polinucleótido que tiene nucleobases contiguas que se hibridan en condiciones rigurosas al ácido nucleico de referencia. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que son sustancialmente homólogos a un ácido nucleico de referencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 3-6, 17, 77, 84, 86, 88, 90 y 93 son aquellos ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones rigurosas (*por ejemplo*, las condiciones de rigurosidad moderada establecidas, *más arriba*) al ácido nucleico de referencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 3-6, 17, 77, 84, 86, 88, 90 y 93. Los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener al menos un 80 % de identidad de secuencia. Por ejemplo, los polirribonucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener de aproximadamente 80 % a 100 % de identidad de secuencia, tal como de 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 % alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; y alrededor de 100 %.

40 Condiciones de rigurosidad moderada establecidas, (*más arriba*) para el ácido nucleico de referencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 3-6, 17, 77, 84, 86, 88, 90 y 93. Los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener al menos un 80 % de identidad de secuencia. Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una identidad de secuencia de aproximadamente 80 % a 100 % con el ácido nucleico de referencia de SEQ ID NO: 1, tal como 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 %; alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; y alrededor de 100 %.

45 Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una identidad de secuencia de aproximadamente 80 % a 100 % con el ácido nucleico de referencia de SEQ ID NO: 3, tal como 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 %; alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; y alrededor de 100 %.

50 Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una identidad de secuencia de aproximadamente 80 % a 100 % con el ácido nucleico de referencia de SEQ ID NO: 4, tal como 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 %; alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; y alrededor de 100 %.

55 Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una identidad de secuencia de aproximadamente 80 % a 100 % con el ácido nucleico de referencia de SEQ ID NO: 5, tal como 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 %; alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; y alrededor de 100 %.

60 Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una identidad de secuencia de aproximadamente 80 % a 100 % con el ácido nucleico de referencia de SEQ ID NO: 6, tal

65

como 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 %; alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; y alrededor de 100 %. Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una identidad de secuencia de aproximadamente 80 % a 100 % con el ácido nucleico de referencia de SEQ ID NO: 17, tal como 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 %; alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; y alrededor de 100 %. Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una identidad de secuencia de aproximadamente 80 % a 100 % con el ácido nucleico de referencia de SEQ ID NO: 77, tal como 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 %; alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; y alrededor de 100 %. Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una identidad de secuencia de aproximadamente 80 % a 100 % con el ácido nucleico de referencia de SEQ ID NO: 84, tal como 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 %; alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; y alrededor de 100 %. Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una identidad de secuencia de aproximadamente 80 % a 100 % con el ácido nucleico de referencia de SEQ ID NO: 86, tal como 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 %; alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; y alrededor de 100 %. Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una identidad de secuencia de aproximadamente 80 % a 100 % con el ácido nucleico de referencia de SEQ ID NO: 88, tal como 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 %; alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; y alrededor de 100 %. Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una identidad de secuencia de aproximadamente 80 % a 100 % con el ácido nucleico de referencia de SEQ ID NO: 90, tal como 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 %; alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; y alrededor de 100 %. Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener una identidad de secuencia de aproximadamente 80 % a 100 % con el ácido nucleico de referencia de SEQ ID NO: 93, tal como 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 %; alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; y alrededor de 100 %. La propiedad de la homología sustancial está estrechamente relacionada con la hibridación específica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico es específicamente hibridable cuando hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del ácido nucleico a polinucleótidos no objetivo en condiciones en las que se desea una unión específica, por ejemplo, en condiciones de hibridación rigurosas.

Como se usa en la presente descripción, el término "ortólogo" se refiere a un gen en dos o más especies que ha evolucionado a partir de un ácido nucleico ancestral común y puede retener la misma función en las dos o más especies.

Como se usa en la presente descripción, se dice que dos moléculas de ácido nucleico exhiben "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de un polinucleótido leído en la dirección 5' a 3' es complementario a cada nucleótido del otro polinucleótido cuando se lee en la dirección 3' a 5'. Un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido de referencia exhibirá una secuencia idéntica al complemento inverso del polinucleótido de referencia. Estos términos y descripciones están bien definidos en la técnica y son fácilmente entendibles por los expertos en la técnica.

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

El término "operativamente unido", cuando se usa en referencia a un elemento genético regulador y un polinucleótido codificante, significa que el elemento regulador afecta la expresión del polinucleótido codificante unido. Los "elementos reguladores" o "elementos de control" se refieren a polinucleótidos que influyen en el momento y el nivel/cantidad de transcripción, procesamiento o estabilidad de ARN, o traducción del polinucleótido codificante asociado. Los elementos

reguladores pueden incluir promotores; líderes de traducción; intrones; potenciadores; estructuras de tallo-lazo; polinucleótidos de unión al represor; polinucleótidos con una secuencia de terminación; polinucleótidos con una secuencia de reconocimiento de poliadenilación; etc. Se pueden ubicar elementos reguladores particulares aguas arriba y/o aguas abajo de un polinucleótido codificante operativamente unido al mismo. Además, elementos reguladores particulares operativamente unidos a un polinucleótido codificante pueden estar ubicados en la cadena complementaria asociada de una molécula de ácido nucleico bicatenario.

Promotor: Como se usa en la presente descripción, el término "promotor" se refiere a una región de ADN que puede estar aguas arriba desde el inicio de la transcripción, y que puede estar implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un promotor puede estar operativamente unido a un polinucleótido codificante para la expresión en una célula, o un promotor puede estar operativamente unido a un polinucleótido que codifica un péptido señal que puede estar operativamente unido a un polinucleótido codificante para la expresión en una célula. Un "promotor vegetal" puede ser un promotor capaz de iniciar la transcripción en células vegetales. Los ejemplos de promotores bajo el control del desarrollo incluyen promotores que preferentemente inician la transcripción en determinados tejidos, tales como hojas, raíces, semillas, fibras, vasos xilemáticos, traqueidas, o esclerénquima. Tales promotores son referidos como "preferidos del tejido". Los promotores que inician la transcripción solamente en determinados tejidos son referidos como "específicos del tejido". Un promotor "celular tipo específico" impulsa principalmente la expresión en ciertos tipos celulares en uno o más órganos, por ejemplo, células vasculares en raíces u hojas. Un promotor "inducible" puede ser un promotor que puede estar bajo control ambiental. Ejemplos de condiciones ambientales que pueden iniciar la transcripción por los promotores inducibles incluyen las condiciones anaeróbicas y la presencia de luz. Los promotores específicos del tejido, preferidos del tejido, tipo celular específicos, e inducibles constituyen la clase de promotores "no constitutivos". Un promotor "constitutivo" es un promotor que puede estar activo en la mayoría de las condiciones ambientales o en la mayoría de tejidos o tipos celulares.

Puede usarse cualquier promotor inducible en algunas modalidades de la invención. Véase Ward y otros (1993) Plant Mol. Biol. 22:361-366. Con un promotor inducible, la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Los promotores inducibles ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: Promotores a partir del sistema ACEI que responde al cobre; el gen *In2* a partir del maíz que responde a los protectores de herbicidas de bencenosulfonamida; el represor Tet a partir de Tn10; y el promotor inducible a partir de un gen de hormona esteroidea, cuya actividad transcripcional puede estar inducida por una hormona glucocorticoesteroide (Schena y otros (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 88:0421).

Los promotores constitutivos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: Promotores a partir de virus de plantas, tales como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV, por sus siglas en inglés); promotores de los genes de la actina de arroz; promotores de ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 de maíz; y el promotor de ALS, el fragmento *Xba1/NcoI* 5' al gen estructural *Brassica napus* ALS3 (o un polinucleótido similar a dicho fragmento *Xba1/NcoI*) (publicación de patente internacional PCT No. WO 96/30530).

Adicionalmente, cualquier promotor específico del tejido o preferido del tejido puede utilizarse en algunas modalidades de la invención. Las plantas transformadas con una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido codificante operativamente unido a un promotor específico del tejido pueden producir el producto del polinucleótido codificante exclusivamente, o preferentemente, en un tejido específico. Los promotores específicos del tejido o preferidos del tejido ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: Un promotor preferido de la raíz, tal como el del gen de la faseolina; un promotor específico de hoja e inducible por la luz tal como el de *cab* o *rubisco*; un promotor específico de antera tal como el de *LAT52*; un promotor específico del polen tal como el de *Zm13*; y un promotor preferido de microspora tal como el de *apg*.

Planta Brassica: Como se usa en la presente descripción, los términos "colza", "colza oleaginosa", "colza" y "canola" se usan indistintamente y se refieren a una planta de la especie *Brassica*; por ejemplo, *B. napus*.

Transformación: Como se usa en la presente descripción, el término "transformación" o "transducción" se refiere a la transferencia de una o más moléculas de ácido nucleico a una célula. Una célula está "transformada" por una molécula de ácido nucleico que se transduce en la célula cuando la molécula de ácido nucleico se replica de manera estable en la célula, ya sea mediante la incorporación de la molécula de ácido nucleico en el genoma celular, o mediante replicación episomal. Como se usa en la presente descripción, 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 y otros (1986) Nature 319:791-3); lipofección (Felgner y otros (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 84:7413-7); microinyección (Mueller y otros (1978) Cell 15:579-85); transferencia mediada por *Agrobacterium* (Fraley y otros (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 80:4803-7); captación directa de ADN; y bombardeo de microproyectiles (Klein y otros (1987) Nature 327:70).

Transgen: Un ácido nucleico exógeno. En algunos ejemplos, un transgen puede ser un ADN que codifica una o ambas cadenas de un ARN capaz de formar una molécula de ARNs que comprende un polinucleótido que es complementario a una molécula de ácido nucleico encontrada en una plaga de coleópteros. En otros ejemplos, un transgen puede ser un polinucleótido antisentido, en donde la expresión del polinucleótido antisentido inhibe la expresión de un ácido nucleico objetivo. En aún otros ejemplos, un transgen puede ser un gen (*por ejemplo*, un gen de tolerancia a herbicidas, un gen que codifica un compuesto útil industrial o farmacéuticamente, o un gen que codifica un rasgo agrícola conveniente). En

estos y otros ejemplos, un transgen puede contener elementos reguladores operativamente unidos a un polinucleótido codificante del transgén (*por ejemplo*, un promotor).

5 Vector: Una molécula de ácido nucleico tal como se introduce en una célula, por ejemplo, para producir una célula transformada. Un vector puede incluir elementos genéticos que le permitan replicarse en la célula huésped, tales como un origen de replicación. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a: un plásmido; un cósmido; un bacteriófago; o un virus que transporta ADN exógeno a una célula. Un vector puede incluir también, uno o más genes, incluidos los que producen moléculas antisentido, y/o genes marcadores de selección y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, lo que causa de 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, recubrimiento de proteína, *etc.*).

15 Rendimiento: Un rendimiento estabilizado de alrededor de 100 % o superior con relación al rendimiento de las variedades chequeadas en el mismo lugar de cultivo que crecen al mismo tiempo y en las mismas condiciones. En modalidades particulares, "rendimiento mejorado" o "al mejorar el rendimiento" significa un cultivar que tiene un rendimiento estabilizado de 105 % o superior con relación al rendimiento de las variedades chequeadas en el mismo lugar de cultivo que contiene densidades significativas de las plagas de coleópteros que son perjudiciales para ese cultivo en crecimiento al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones, que son objeto de las composiciones y métodos en la presente descripción.

20 A menos que se indique o se dé a entender específicamente, los términos "un", "una" y "el/la" significan "al menos uno", como se usa en la presente descripción.

25 A menos que se explique específicamente de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece esta descripción. Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en, por ejemplo, Lewin's Genes X, Jones & Bartlett Publishers, 2009 (ISBN 10 0763766321); Krebs y otros (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Meyers R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de la mezcla de solventes son en volumen a menos que de cualquier otra manera se note. Todas las temperaturas son en grados Celsius.

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

35 A. Visión general

En la presente descripción se describen moléculas de ácido nucleico útiles para el control de plagas de insectos. La plaga de insectos es una plaga de insectos coleópteros. Las moléculas de ácido nucleico descritas incluyen polinucleótidos objetivo (*por ejemplo*, genes nativos y polinucleótidos no codificantes), ARNdss, siARNs, shARNs, hpARNs y miARNs. Por ejemplo, las moléculas de hpARN se describen en algunas modalidades que pueden ser específicamente complementarias a todo o parte de uno o más ácidos nucleicos nativos en una plaga de coleópteros. En estas y otras modalidades, los ácidos nucleicos nativos pueden ser uno o más genes objetivos, cuyo producto puede estar, por ejemplo y sin limitación: involucrado en un proceso metabólico o involucrado en el desarrollo larvario. Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente descripción, cuando se introducen en una célula que comprende al menos uno o más ácidos nucleicos nativos a los que las moléculas de ácido nucleico son específicamente complementarias, pueden iniciar el ARNi en la célula y, consecuentemente, reducir o eliminar la expresión de ácido(s) nucleico(s) nativo(s). En algunos ejemplos, la reducción o eliminación de la expresión de un gen objetivo por una molécula de ácido nucleico específicamente complementaria a la misma puede resultar en la reducción o el cese del crecimiento, desarrollo y/o alimentación en la plaga de coleópteros.

50 En algunas modalidades, se puede seleccionar al menos un gen objetivo en una plaga de insectos, en donde el gen objetivo comprende un polinucleótido *ncm*. En ejemplos particulares, se selecciona un gen objetivo en una plaga de coleópteros, en donde el gen objetivo comprende un polinucleótido seleccionado de las SEQ ID NOs: 1, 3-6, 77, 84, 86, 88, 90 y 93.

55 En algunas modalidades, un gen objetivo puede ser una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que puede traducirse inversamente *in silico* a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos, alrededor de 85 % idéntica (*por ejemplo*, al menos 84 %, 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 %, alrededor de 100 % o 100 % idéntico) a la secuencia de aminoácidos de un producto proteico de un polinucleótido *ncm*. Un gen objetivo puede ser cualquier polinucleótido *ncm* en una plaga de insectos, cuya inhibición postranscripcional tiene un efecto nocivo sobre el crecimiento y/o supervivencia de la plaga, por ejemplo, para proporcionar un beneficio protector contra la plaga a una planta. En ejemplos particulares, un gen objetivo es una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que puede traducirse inversamente *in silico* a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos alrededor de 85 % idéntica, alrededor de 90 % idéntica, alrededor de 95 % idéntica, alrededor de 96 % idéntica, alrededor de 97 % idéntica, alrededor de 98 % idéntica, alrededor de 99 % idéntica, alrededor de 100 % idéntico o 100 % idéntico a la secuencia de

- aminoácidos de las SEQ ID NOs: 2, 85, 87, 89 y 94. En ejemplos particulares, un gen objetivo es una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que puede traducirse inversamente *in silico* a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos alrededor de 85 % idéntica, alrededor de 90 % idéntica, alrededor de 95 % idéntica, alrededor de 96 % idéntica, alrededor de 97 % idéntica, alrededor de 98 % idéntica, alrededor de 99 % idéntica, alrededor de 100 % idéntico o 100 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:2. En ejemplos particulares, un gen objetivo es una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que puede traducirse inversamente *in silico* a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos alrededor de 85 % idéntica, alrededor de 90 % idéntica, alrededor de 95 % idéntica, alrededor de 96 % idéntica, alrededor de 97 % idéntica, alrededor de 98 % idéntica, alrededor de 99 % idéntica, alrededor de 100 % idéntico o 100 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:85. En ejemplos particulares, un gen objetivo es una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que puede traducirse inversamente *in silico* a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos alrededor de 85 % idéntica, alrededor de 90 % idéntica, alrededor de 95 % idéntica, alrededor de 96 % idéntica, alrededor de 97 % idéntica, alrededor de 98 % idéntica, alrededor de 99 % idéntica, alrededor de 100 % idéntico o 100 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:89. En ejemplos particulares, un gen objetivo es una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que puede traducirse inversamente *in silico* a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos alrededor de 85 % idéntica, alrededor de 90 % idéntica, alrededor de 95 % idéntica, alrededor de 96 % idéntica, alrededor de 97 % idéntica, alrededor de 98 % idéntica, alrededor de 99 % idéntica, alrededor de 100 % idéntico o 100 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:94.
- De acuerdo con la invención, se proporcionan ADNs, cuya expresión resulta en una molécula de ARN que comprende un polinucleótido que es específicamente complementario de toda o parte de una molécula de ARN nativo que está codificada por un polinucleótido codificante en una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). En algunas modalidades, después de la ingestión por una plaga de insectos de la molécula de ARN expresada, puede obtenerse una regulación negativa del polinucleótido codificante en las células de la plaga. En modalidades particulares, la regulación negativa de la secuencia codificante en células de la plaga de insectos puede resultar en un efecto nocivo sobre el crecimiento y/o desarrollo de la plaga.
- En algunas modalidades, los polinucleótidos objetivo incluyen ARN no codificantes transcritos, tales como 5'UTRs; 3'UTRs; líderes empalmados; intrones, outrones (*por ejemplo*, ARN 5'UTR subsecuentemente modificado en empalme *trans*); donatrones (*por ejemplo*, ARN no codificante requerido para proporcionar secuencias donantes para empalme *trans*); y otros ARN transcritos no codificantes de genes objetivo de plagas de insectos. Dichos polinucleótidos pueden derivarse a partir de genes mono-cistrónicos y poli-cistrónicos.
- Por lo tanto, también se describe en la presente descripción en relación con algunas modalidades las moléculas de iARN (hpARNs) que comprenden al menos un polinucleótido que es específicamente complementario de todo o parte de un ácido nucleico objetivo en una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). En algunas modalidades, una molécula de iARN puede comprender polinucleótido(s) que son complementarios a todo o parte de una pluralidad de ácidos nucleicos objetivos; por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más ácidos nucleicos objetivos. En modalidades particulares, se puede producir una molécula de iARN *in vitro* o *in vivo* por un organismo genéticamente modificado, tal como una planta o bacteria. También se describen ADNcs que pueden usarse para la producción de moléculas de ARNds, moléculas de siARN, moléculas de miARN, moléculas de shARN y/o moléculas de hpARN que son específicamente complementarias a todo o parte de un ácido nucleico objetivo en una plaga de insectos. Además, se describen constructos de ADN recombinante para usar en el logro de la transformación estable de objetivos particulares del huésped. Los objetivos del huésped transformado pueden expresar niveles efectivos de moléculas de ARNds, siARN, miARN, shARN y/o hpARN a partir de los constructos de ADN recombinante. Por lo tanto, también se describe un vector de transformación vegetal que comprende al menos un polinucleótido operativamente unido a un promotor heterólogo funcional en una célula vegetal, en donde la expresión de los polinucleótidos resulta en una molécula de ARN que comprende una cadena de nucleobases contiguas que es específicamente complementaria a todo o parte de un ácido nucleico objetivo en una plaga de insectos.
- En ejemplos particulares, las moléculas de ácido nucleico útiles para el control de plagas de insectos (*por ejemplo*, coleóptero) pueden incluir: todo o parte de un ácido nucleico nativo aislado a partir de *Diabrotica* que comprende un polinucleótido *ncm* (*por ejemplo*, cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 3-6 y 77); todo o parte de un ácido nucleico nativo aislado a partir de *Meligethes aeneus* que comprende un polinucleótido *ncm* (*por ejemplo*, cualquiera de las SEQ ID NOs: 84, 86, 88, 90 y 93); los ADNcs que, cuando se expresan, resultan en una molécula de ARN que comprende un polinucleótido que es específicamente complementario a toda o parte de una molécula de ARN nativo que está codificada por *ncm*; las moléculas de iARN (*por ejemplo*, las ARNds, siARNs, miARNs, shARNs y hpARNs) que comprenden al menos un polinucleótido que es específicamente complementario a todo o parte de *ncm*; los ADNcs que pueden usarse para la producción de moléculas de ARNds, moléculas de siARN, moléculas de miARN, moléculas de shARN y/o moléculas de hpARN que son específicamente complementarias a todo o parte de *ncm*; y constructos de ADN recombinante para uso en el logro de la transformación estable de objetivos particulares del huésped, en donde un objetivo del huésped transformado comprende una o más de las moléculas de ácido nucleico anteriores.

B. Moléculas de ácido nucleico

La presente invención proporciona, *entre otros*, las moléculas de iARN (hpARN) que inhiben la expresión del gen objetivo en una célula, tejido u órgano de una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero); y moléculas de ADN capaces de expresarse como una molécula de iARN en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen objetivo en una célula, tejido u órgano de una plaga de insectos.

Algunas modalidades de la invención proporcionan una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos un (*por ejemplo*, uno, dos, tres o más) polinucleótido(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en: SEQ ID NOs: 1, 77, 84, 86, 88 y 93; el complemento de SEQ ID NO:1, 77, 84, 86, 88 o 93; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:84, 86, 88 o 93; el complemento de al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 84, 86, 88 o 93; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* (*por ejemplo*, PB) que comprende la SEQ ID NO:84, 86, 88 o 93; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:84, 86, 88 o 93; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:84, 86, 88 o 93; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:84, 86, 88 o 93. En modalidades particulares, el contacto o la absorción por una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero) de un iARN transcrito a partir del polinucleótido aislado inhibe el crecimiento, desarrollo y/o alimentación de la plaga.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención puede comprender al menos un (*por ejemplo*, uno, dos, tres o más) polinucleótido(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en: un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:84, 86, 88 y/o 93; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:84, 86, 88 y/o 93; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo planta *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:84, 86, 88 y/o 93; y el complemento de un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:84, 86, 88 y/o 93. En modalidades particulares, el contacto o la absorción por una plaga de coleópteros del polinucleótido aislado inhibe el crecimiento, desarrollo y/o alimentación de la plaga.

En ciertas modalidades, las moléculas de ARNs proporcionadas por la invención comprenden polinucleótidos complementarios a una transcrita a partir de un gen objetivo que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 84, 86, 88 y 93, y fragmentos de estos, cuya inhibición del gen objetivo en una plaga de insectos resulta en la reducción o eliminación de un agente polipeptídico o polinucleotídico que es esencial para el crecimiento, desarrollo u otra función biológica de la plaga. Un gen objetivo seleccionado puede exhibir una identidad de secuencia de aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 % con cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 77, 84, 86, 88 y 93; un fragmento contiguo de SEQ ID NO:1, 77, 84, 86, 88 y/o 93; y el complemento de cualquiera de las anteriores. Por ejemplo, un gen objetivo seleccionado puede exhibir 79 %; 80 %; alrededor de 81 %; alrededor de 82 %; alrededor de 83 %; alrededor de 84 %; alrededor de 85 %; alrededor de 86 %; alrededor de 87 %; alrededor de 88 %; alrededor de 89 %; alrededor de 90 %; alrededor de 91 %; alrededor de 92 %; alrededor de 93 %; alrededor de 94 %; alrededor de 95 %; alrededor de 96 %; alrededor de 97 %; alrededor de 98 %; alrededor de 98,5 %; alrededor de 99 %; alrededor de 99,5 %; o alrededor de 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 3-6, 77, 84, 86, 88, 90 y 93; un fragmento contiguo de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 3-6, 77, 84, 86, 88, 90 y 93; y el complemento de cualquiera de las anteriores.

En algunas modalidades, una molécula de ADN capaz de expresarse como una molécula de iARN en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen objetivo puede comprender un solo polinucleótido que es específicamente complementario a todo o parte de un polinucleótido nativo encontrado en una o más especies de plagas de insectos objetivo (*por ejemplo*, una especie de plaga de coleópteros), o la molécula de ADN puede construirse como una quimera a partir de una pluralidad de tales polinucleótidos específicamente complementarios.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico puede comprender un primer y un segundo polinucleótido separados por un "separador." Un separador puede ser una región que comprende cualquier secuencia de nucleótidos que facilite la formación de estructuras secundarias entre los polinucleótidos primero y segundo, donde se desee. En una modalidad, el separador es parte de un polinucleótido codificante sentido o antisentido para ARNm. El separador puede comprender alternativamente cualquier combinación de nucleótidos u homólogos de estos que sean capaces de unirse covalentemente a una molécula de ácido nucleico.

Por ejemplo, en algunas modalidades, la molécula de ADN puede comprender un polinucleótido que codifica para una o más moléculas de iARN diferentes, en donde cada una de las diferentes moléculas de iARN comprende un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, en donde los polinucleótidos primero y segundo son complementarios entre sí. Los polinucleótidos primero y segundo pueden estar conectados dentro de una molécula de ARN por un separador. El separador puede constituir parte del primer polinucleótido o el segundo polinucleótido. La expresión de una molécula de ARN que comprende el primer y segundo polinucleótidos de nucleótidos puede provocar la formación de una molécula de ARNs, por apareamiento de bases intramoleculares específicas del primer y segundo polinucleótidos de nucleótidos. El primer polinucleótido o el segundo polinucleótido pueden ser sustancialmente idénticos a un polinucleótido (*por ejemplo*,

un gen objetivo o polinucleótido no codificante transcrito) nativo de una plaga de insectos (*por ejemplo*, una plaga de coleópteros), un derivado de este, o un polinucleótido complementario al mismo.

5 Las moléculas de ácido nucleico de ARNds comprenden cadenas dobles de ribonucleótidos polimerizados, y pueden incluir modificaciones a la cadena principal de fosfato-azúcar o al nucleósido. Las modificaciones en la estructura del ARN pueden adaptarse para permitir la inhibición específica. En una modalidad, las moléculas de ARNds pueden modificarse a través de un proceso enzimático ubicuo para que puedan generarse moléculas de siARN. Este proceso enzimático puede utilizar una enzima RNasa III, tal como DICER en eucariotas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Véase Elbashir y otros (2001) Nature 411:494-8; y Hamilton y Baulcombe (1999) Science 286(5441):950-2. DICER o enzimas RNasa III funcionalmente equivalentes escinden cadenas de ARNds más grandes y/o moléculas de hpARN en oligonucleótidos más pequeños (*por ejemplo*, siARNs), cada uno de los cuales tiene alrededor de 19-25 nucleótidos de longitud. Las moléculas de siARN producidas por estas enzimas tienen de 2 a 3 nucleótidos salientes 3', y fosfato 5' e hidroxilo 3' terminales. Las moléculas de siARN generadas por las enzimas RNasa III se desenrollan y se separan en ARN monocatenario en la célula. Las moléculas de siARN se hibridan específicamente con los ARNs transcritos a partir de un gen objetivo, y ambas moléculas de ARN se degradan subsecuentemente por un mecanismo inherente de degradación del ARN celular. Este proceso puede resultar en la degradación o eliminación efectiva del ARN codificado por el gen objetivo en el organismo objetivo. El resultado es el silenciamiento postranscripcional del gen objetivo. En algunas modalidades, las moléculas de siARN producidas por enzimas RNasa III a partir de moléculas de ácido nucleico heterólogo pueden mediar eficientemente la regulación negativa de genes objetivo en plagas de insectos.

20 En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico puede incluir al menos un polinucleótido de origen no natural que puede transcribirse en una molécula de ARN monocatenario capaz de formar una molécula de ARNds *in vivo* a través de la hibridación intermolecular. Tales ARNds típicamente se autoensamblan y pueden proporcionarse en la fuente de nutrición de una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero) para lograr la inhibición postranscripcional de un gen objetivo. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico puede comprender dos polinucleótidos diferentes de origen no natural, cada uno de los cuales es específicamente complementario a un gen objetivo diferente en una plaga de insectos. Cuando dicha molécula de ácido nucleico se proporciona como una molécula de ARNds para, *por ejemplo*, una plaga de coleópteros, la molécula de ARNds inhibe la expresión de al menos dos genes objetivo diferentes en la plaga.

30 C. Obtención de moléculas de ácido nucleico

Una variedad de polinucleótidos en plagas de insectos (*por ejemplo*, coleóptero) pueden usarse como objetivos para el diseño de moléculas de ácido nucleico, tales como iARNs y las moléculas de ADN que codifican los iARNs. La selección de polinucleótidos nativos no es, sin embargo, un proceso directo. *Por ejemplo*, solo un pequeño número de polinucleótidos nativos en una plaga de coleópteros serán objetivos efectivos. No se puede predecir con certeza si un polinucleótido nativo particular puede ser regulado negativamente con efectividad por las moléculas de ácido nucleico de la invención, o si la regulación negativa de un polinucleótido nativo particular tendrá un efecto perjudicial sobre el crecimiento, desarrollo y/o viabilidad de una plaga de insectos. La gran mayoría de los polinucleótidos de plaga de coleópteros nativos, tales como los ESTs aislados de los mismos (*por ejemplo*, los polinucleótidos de plaga de coleópteros enumerados en la patente de Estados Unidos 7,612,194), no tienen un efecto perjudicial sobre el crecimiento y/o la viabilidad de la plaga. Tampoco es predecible cuáles de los polinucleótidos nativos que pueden tener un efecto perjudicial sobre una plaga de insectos pueden usarse en técnicas recombinantes para expresar moléculas de ácido nucleico complementarias a dichos polinucleótidos nativos en una planta huésped y proporcionar el efecto perjudicial sobre la plaga al alimentarse sin causar daño a la planta huésped.

45 En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico (*por ejemplo*, moléculas de ARNds para proporcionar en la planta huésped de una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero)) se seleccionan para marcar los ADNcs que codifican proteínas o partes de proteínas esenciales para el desarrollo de la plaga, tales como polipéptidos involucrados en vías bioquímicas metabólicas o catabólicas, división celular, metabolismo energético, digestión, reconocimiento de la planta hospedera, y similares. Como se describe en la presente descripción, la ingestión de composiciones por parte de un organismo de plaga objetivo que contiene uno o más ARNds, de los cuales al menos un segmento es específicamente complementario a al menos un segmento sustancialmente idéntico de ARN producido en las células del organismo de plaga objetivo, puede resultar en la muerte u otra inhibición del objetivo. Puede usarse un polinucleótido, ya sea ADN o ARN, derivado a partir de una plaga de insectos para construir células vegetales resistentes a la infestación por las plagas. La planta huésped de la plaga de coleópteros (*por ejemplo*, *Z. mays* o *Brassica*), *por ejemplo*, puede transformarse para contener uno o más polinucleótidos derivados a partir de la plaga de coleópteros como se proporcionan en la presente descripción. El polinucleótido transformado dentro del huésped puede codificar uno o más ARNs que se forman en una estructura de ARNds en las células o fluidos biológicos dentro del huésped transformado, lo que hace, *por lo tanto*, que el ARNds esté disponible si/cuando la plaga forma una relación nutricional con el huésped transgénico. Esto puede resultar en la supresión de la expresión de uno o más genes en las células de la plaga y, en última instancia, la muerte o la inhibición de su crecimiento o desarrollo.

60 Por lo tanto, en algunas modalidades, se dirige un gen que está esencialmente involucrado en el crecimiento y/o desarrollo de una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). Otros genes objetivo para usar en la presente invención pueden incluir, *por ejemplo*, aquellos que juegan papeles importantes en la viabilidad de la plaga, movimiento, migración, crecimiento, desarrollo, infectividad y establecimiento de sitios de alimentación. *Por lo tanto*, un gen objetivo puede ser un

gen de limpieza o un factor de transcripción. Adicionalmente, un polinucleótido nativo de plaga de insectos para usar en la presente invención también puede derivarse a partir de un homólogo (*por ejemplo*, un ortólogo), de un gen vegetal, viral, bacteriano o de insectos, cuya función es conocida por los expertos en la técnica, y cuyo polinucleótido es específicamente hibridable con un gen objetivo en el genoma de la plaga objetivo. Los métodos para identificar un homólogo de un gen con una secuencia de nucleótidos conocida por hibridación son conocidos por los expertos en la técnica.

Algunos aspectos de la descripción proporcionan métodos para obtener una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido para producir una molécula de iARN (*por ejemplo*, ARNds, siARN, miARN, shARN y hpARN). Uno de esos aspectos de la descripción comprende: (a) analizar uno o más gen(es) objetivo para su expresión, función y fenotipo tras la supresión génica mediada por ARNds en una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero); (b) sondear una biblioteca de ADNc o ADNg con una sonda que comprende todo o una porción de un polinucleótido o un homólogo de este a partir de una plaga marcada que muestra una alteración (*por ejemplo*, reducido) fenotipo de crecimiento o desarrollo en un análisis de supresión mediada por ARNds; (c) identificar un clon de ADN que hibrida específicamente con la sonda; (d) aislar el clon de ADN identificado en la etapa (b); (e) secuenciar el fragmento de ADNc o ADNg que comprende el clon aislado en la etapa (d), en donde la molécula de ácido nucleico secuenciada comprende todo o una porción sustancial del ARN o un homólogo de este; y (f) sintetizar químicamente todo o una porción sustancial de un gen, o un siARN, miARN, hpARN, ARNm, shARN o ARNds.

En aspectos adicionales de la descripción, un método para obtener un fragmento de ácido nucleico que comprende un polinucleótido para producir una porción sustancial de una molécula de iARN (*por ejemplo*, ARNds, siARN, miARN, shARN y hpARN) incluye: (a) sintetizar cebadores oligonucleotídicos primero y segundo específicamente complementarios a una porción de un polinucleótido nativo a partir de una plaga de insectos objetivo (*por ejemplo*, coleóptero); y (b) amplificar un inserto de ADNc o ADNg presente en un vector de clonación mediante el uso de cebadores oligonucleotídicos primero y segundo de la etapa (a), en donde la molécula de ácido nucleico amplificada comprende una porción sustancial de una molécula de siARN, miARN, hpARN, ARNm, shARN o ARNds.

Los ácidos nucleicos pueden aislarse, amplificarse o producirse por una serie de enfoques. Por ejemplo, una molécula de iARN (*por ejemplo*, ARNds, siARN, miARN, shARN y hpARN) pueden obtenerse mediante amplificación por PCR de un polinucleótido objetivo (*por ejemplo*, un gen objetivo o un polinucleótido no codificante transcrito objetivo) derivado a partir de una biblioteca de ADNg o ADNc, o porciones de estos. Se puede extraer ADN o ARN de un organismo objetivo, y a partir de ellos pueden prepararse bibliotecas de ácido nucleico mediante el uso de métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica. Las bibliotecas de ADNg o ADNc generadas a partir de un organismo objetivo pueden usarse para la amplificación por PCR y la secuenciación de genes objetivo. Un producto de PCR confirmado puede usarse como molde para la transcripción *in vitro* para generar ARN sentido y antisentido con promotores mínimos. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico pueden sintetizarse por cualquiera de una serie de técnicas (*véase, por ejemplo*, Ozaki y otros (1992) *Nucleic Acids Research*, 20: 5205-5214; y Agrawal y otros (1990) *Nucleic Acids Research*, 18: 5419-5423), incluido el uso de un sintetizador de ADN automatizado (*por ejemplo*, un sintetizador de ADN/ARN de PE Biosystems, Inc. (Foster City, California) modelo 392 o 394), mediante el uso de productos químicos estándar, tales como la química de fosforamida. Véase, *por ejemplo*, Beaucage y otros (1992) *Tetrahedron*, 48: 2223-2311; patente de Estados Unidos 4,980,460, 4,725,677, 4,415,732, 4,458,066, y 4,973,679. Además, se pueden emplear químicas alternativas que resultan en grupos del esqueleto no naturales, tales como fosforotioato, fosforamidoato, y similares.

Una molécula de hpARN de la presente invención puede ser producida química o enzimáticamente por un experto en la técnica a través de reacciones manuales o automatizadas, o *in vivo* en una célula que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica la molécula de hpARN. El ARN también puede producirse por síntesis orgánica parcial o total; cualquier ribonucleótido modificado puede introducirse por síntesis enzimática u orgánica *in vitro*. Una molécula de ARN puede ser sintetizada por una ARN polimerasa celular o una ARN polimerasa bacteriófaga (*por ejemplo*, ARN polimerasa T3, ARN polimerasa T7 y ARN polimerasa SP6). Los constructos de expresión útiles para la clonación y expresión de polinucleótidos son conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, publicación de patente internacional PCT No. WO97/32016; y las patentes de Estados Unidos 5,593,874, 5,698,425, 5,712,135, 5,789,214, y 5,804,693. Las moléculas de ARN que se sintetizan químicamente o por síntesis enzimática *in vitro* pueden purificarse antes de la introducción en una célula. Por ejemplo, las moléculas de ARN pueden purificarse a partir de una mezcla mediante extracción con un solvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía o una combinación de estos. Alternativamente, las moléculas de ARN que se sintetizan químicamente o por síntesis enzimática *in vitro* pueden usarse sin purificación o con un mínimo de purificación, *por ejemplo*, para evitar pérdidas debido al procesamiento de la muestra. Las moléculas de ARN pueden secarse para almacenamiento o disolverse en una solución acuosa. La solución puede contener tampones o sales para promover el alineamiento y/o la estabilización de las cadenas dúplex de la molécula de ARNds.

En modalidades, una molécula de ARNds puede estar formada por una sola cadena de ARN autocomplementaria o por dos cadenas de ARN complementarias. Las moléculas de ARNds pueden sintetizarse *in vivo* o *in vitro*. Una ARN polimerasa endógena de la célula puede mediar la transcripción de una o dos cadenas de ARN *in vivo*, o la ARN polimerasa clonada puede usarse para mediar la transcripción *in vivo* o *in vitro*. La inhibición postranscripcional de un gen objetivo en una plaga de insectos puede ser dirigida al huésped por transcripción específica en un órgano, tejido o tipo celular del huésped (*por ejemplo*, mediante el uso de un promotor específico del tejido); estimulación de una condición

5 ambiental en el huésped (*por ejemplo*, mediante el uso de un promotor inducible que responda a infecciones, estrés, temperatura y/o inductores químicos); y/o transcripción de ingeniería en una etapa 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 ARNs, ya sea transcrita *in vitro* o *in vivo*, puede o no estar poliadenilada, y puede o no ser capaz de ser traducida a un polipéptido por un aparato traduccional de la célula.

D. Vectores recombinantes y transformación de la célula huésped

10 En algunas modalidades, la invención también proporciona una molécula de ADN para la introducción en una célula (*por ejemplo*, una célula bacteriana, una célula de levadura o una célula vegetal), en donde la molécula de ADN comprende un polinucleótido que, tras la expresión en ARN y la ingestión por una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero), logra la supresión de un gen objetivo en una célula, tejido u órgano de la plaga. Por lo tanto, algunas modalidades proporcionan una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un polinucleótido capaz de expresarse como una molécula de iARN (hpARN) en una célula vegetal para inhibir la expresión del gen objetivo en una plaga de insectos. Para iniciar o mejorar la expresión, tales moléculas de ácido nucleico recombinante pueden comprender uno o más elementos reguladores, cuyos elementos reguladores pueden estar operativamente unidos al polinucleótido capaz de expresarse como un iARN. Se conocen métodos para expresar una molécula de supresión génica en plantas, y pueden usarse para expresar un polinucleótido de la presente invención. Véase, *por ejemplo*, la publicación de patente internacional PCT No. WO06/073727; y la publicación de patente de Estados Unidos No. 2006/0200878 A1)

20 En modalidades, una molécula de ADN recombinante de la invención comprende un polinucleótido que codifica un ARN que puede formar una molécula de ARNs. Dichas moléculas de ADN recombinante pueden codificar ARNs que pueden formar moléculas de ARNs capaces de inhibir la expresión de gen(es) objetivo endógeno(s) en una célula de plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero) tras la ingestión. En modalidades, un ARN transcrito forma una molécula de ARNs que puede proporcionarse en una forma estabilizada; *por ejemplo*, como una horquilla y estructura de tallo y lazo.

30 En algunas modalidades, se puede formar una cadena de una molécula de ARNs por transcripción a partir de un polinucleótido que es sustancialmente homólogo a un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 84, 86, 88, y 93; los complementos de las SEQ ID NOs: 84, 86, 88 y 93; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC ID NOs: 84, 86, 88 y 93 (*por ejemplo*, SEQ ID NO:90); el complemento de un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEC ID NOs: 84, 86, 88 y 93; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* (*por ejemplo*, PB) que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 84, 86, 88, 90 y/o 93; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 84, 86, 88, 90 y/o 93; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 84, 86, 88, 90 y/o 93; y el complemento de un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 84, 86, 88, 90 y/o 93.

40 En algunos aspectos de la descripción, se puede formar una cadena de una molécula de ARNs por transcripción a partir de un polinucleótido que es sustancialmente homólogo a un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3-6 y 90; los complementos de las SEQ ID NOs: 3-6 y 90; fragmentos de al menos 15 nucleótidos contiguos de las SEQ ID NOs: 3-6 y 90; y los complementos de fragmentos de al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NOs: 3-6 y 90.

45 En modalidades particulares, una molécula de ADN recombinante que codifica un ARN que puede formar una molécula de ARNs puede comprender una región codificante en donde al menos dos polinucleótidos están dispuestos de manera que un polinucleótido esté en una orientación sentido, y el otro polinucleótido esté en una orientación antisentido, con relación a, al menos, a un promotor, en donde el polinucleótido sentido y el polinucleótido antisentido están unidos o conectados por un separador de, *por ejemplo*, de aproximadamente cinco (~5) a aproximadamente mil (~1000) nucleótidos. El separador puede formar un lazo entre los polinucleótidos sentido y antisentido. El polinucleótido sentido o el polinucleótido antisentido puede ser sustancialmente homólogos a un gen objetivo (*por ejemplo*, un gen *ncm* que comprende la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, y/o SEQ ID NO:93) o un fragmento de estos. Sin embargo, en algunas modalidades, una molécula de ADN recombinante puede codificar un ARN que puede formar una molécula de ARNs sin un separador. En modalidades, un polinucleótido codificante sentido y un polinucleótido codificante antisentido pueden tener diferentes longitudes.

60 Los polinucleótidos identificados como que tienen un efecto nocivo sobre una plaga de insectos o un efecto protector de la planta con respecto a la plaga pueden incorporarse fácilmente en las moléculas de ARNs expresadas a través de la creación de casetes de expresión apropiados en una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención. *Por ejemplo*, dichos polinucleótidos pueden expresarse como una horquilla con estructura de tallo y lazo al tomar un primer segmento correspondiente a un polinucleótido del gen objetivo (*por ejemplo*, un gen *ncm* que comprende la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, y/o SEQ ID NO:93, y fragmentos de cualquiera de los anteriores); unir este polinucleótido a una región separadora del segundo segmento que no es homóloga o complementaria al primer segmento; y unir esto a un tercer segmento, en donde al menos una porción del tercer segmento es sustancialmente complementario al primer segmento. Tal construcción forma una estructura de tallo y lazo mediante el apareamiento de bases intramolecular del primer segmento con el tercer segmento, en donde las formas de estructura

de lazo comprenden el segundo segmento. Véase, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos Nos. 2002/0048814 y 2003/0018993; las publicaciones de patente internacional PCT Nos. WO94/01550 y WO98/05770. Se puede generar una molécula de ARNs, por ejemplo, en forma de una estructura bicatenaria, tal como una estructura de tallo-lazo (por ejemplo, horquilla), de manera que la producción de siARN dirigida a un polinucleótido nativo de plaga de insectos (por ejemplo, coleóptero) se potencia mediante la coexpresión de un fragmento del gen objetivo, por ejemplo, en un casete adicional expresable en plantas, que conduce a una producción de siARN mejorada, o reduce la metilación para evitar el silenciamiento génico transcripcional del promotor de horquilla de ARNs.

Las modalidades de la invención incluyen la introducción de una molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención en una planta (es decir, transformación) para lograr niveles de expresión de una o más moléculas de iARN inhibitorios de plaga de insectos (por ejemplo, coleóptero). Una molécula de ADN recombinante puede ser, por ejemplo, un vector, tal como un plásmido lineal o circular cerrado. El sistema de vectores puede ser un solo vector o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se introducirá dentro del genoma de un huésped. Además, un vector puede ser un vector de expresión. Los ácidos nucleicos de la invención pueden, por ejemplo, insertarse adecuadamente en un vector bajo el control de un promotor adecuado que funciona en uno o más huéspedes para conducir la expresión de un polinucleótido codificador unido u otro elemento de ADN. Se dispone de muchos vectores para este fin, y la selección del vector apropiado dependerá, principalmente, del tamaño del ácido nucleico a insertar dentro del vector y la célula huésped particular a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, en dependencia de su función (por ejemplo, amplificación de ADN y expresión de ADN), y la célula huésped particular con la que es compatible.

Para impartir resistencia a plaga de insectos (por ejemplo, coleóptero) a una planta transgénica, un ADN recombinante puede, por ejemplo, transcribirse en una molécula de iARN (por ejemplo, una molécula de ARN que forma una molécula de ARNs) dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante. Una molécula de iARN puede comprender un polinucleótido que es sustancialmente homólogo y específicamente hibridable con un polinucleótido transcrito correspondiente dentro de una plaga de insectos que puede causar daño a la especie de la planta huésped. La plaga puede contactar con la molécula de iARN que se transcribe en las células de la planta huésped transgénica, por ejemplo, al ingerir células o fluidos de la planta huésped transgénica que comprende la molécula de iARN. Por lo tanto, en ejemplos particulares, la expresión de un gen objetivo es suprimida por la molécula de iARN dentro de las plagas de coleópteros que infestan la planta huésped transgénica. En algunas modalidades, la supresión de la expresión del gen objetivo en una plaga de coleópteros objetivo puede resultar en que la planta sea resistente al ataque de la plaga.

Para permitir el suministro de moléculas de iARN a una plaga de insectos en una relación nutricional con una célula vegetal que se ha transformado con una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención, expresión (es decir, transcripción) de las moléculas de iARN en la célula vegetal. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico recombinante puede comprender un polinucleótido de la invención operativamente unido a uno o más elementos reguladores, tales como un elemento promotor heterólogo que funciona en una célula huésped, tal como una célula bacteriana en donde la molécula de ácido nucleico se va a amplificar, y una célula vegetal en donde se va a expresar la molécula de ácido nucleico.

Los promotores adecuados para uso en las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen aquellos que son inducibles, virales, sintéticos, o constitutivos, todos los cuales se conocen bien en la técnica. Los ejemplos no limitantes que describen tales promotores incluyen las patentes de Estados Unidos 6,437,217 (promotor de maíz RS81); 5,641,876 (promotor de actina de arroz); 6,426,446 (promotor de maíz RS324); 6,429,362 (promotor de maíz PR-1); 6,232,526 (promotor de maíz A3); 6,177,611 (promotores constitutivos de maíz); 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196 (promotor de CaMV 35S); 6,433,252 (promotor de oleosina de maíz L3); 6,429,357 (promotor de actina 2 de arroz, e intrón de actina 2 de arroz); 6,294,714 (promotores inducibles por la luz); 6,140,078 (promotores inducibles por sales); 6,252,138 (promotores inducibles por patógenos); 6,175,060 (promotores inducibles por deficiencia de fósforo); 6,388,170 (promotores bidireccionales); 6,635,806 (promotor de gamma-coixina); y la publicación de patente de Estados Unidos No. 2009/757,089 (promotor de aldolasa de cloroplasto de maíz). Los promotores adicionales incluyen el promotor de nopalina sintasa (NOS) (Ebert y otros (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 84(16):5745-9) y los promotores de octopina sintasa (OCS) (que se transportan en los plásmidos inductores de tumor de *Agrobacterium tumefaciens*); los promotores de caulimovirus tales como el promotor del virus del mosaico de la coliflor 19S (CaMV) (Lawton y otros (1987) Plant Mol. Biol. 9:315-24); el promotor de CaMV 35S (Odell y otros (1985) Nature 313:810-2); el promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia (Walker y otros (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 84(19):6624-8); el promotor de la sacarosa sintasa (Yang and Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 87:4144-8); el promotor del complejo de gene R (Chandler y otros (1989) Plant Cell 1:1175-83); el promotor del gen de la proteína de unión a clorofila a/b; CaMV 35S (patentes de Estados Unidos 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196); FMV 35S (patentes de Estados Unidos 6,051,753, y 5,378,619); un promotor PC1SV (patente de Estados Unidos 5,850,019); el promotor SCP1 (patente de Estados Unidos 6,677,503); y promotores AGRtu.nos (GenBank™ No. de acceso V00087; Depicker y otros (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:561-73; Bevan y otros (1983) Nature 304:184-7).

En modalidades particulares, las moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden un promotor específico del tejido, tal como un promotor específico de la raíz. Los promotores específicos de la raíz impulsan la expresión de polinucleótidos codificantes unidos operativamente de manera exclusiva o preferencial en el tejido de la raíz. Ejemplos de promotores específicos de la raíz son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos 5,110,732;

- 5,459,252 y 5,837,848; y Opperman y otros (1994) *Science* 263:221-3; and Hirel y otros (1992) *Plant Mol. Biol.* 20:207-18. En algunas modalidades, un polinucleótido o fragmento para el control de plaga de coleópteros de acuerdo con la invención puede clonarse entre dos promotores específicos de la raíz orientados en direcciones transcripcionales opuestas con relación al polinucleótido o fragmento, y que son operables en una célula vegetal transgénica y expresados en el mismo para producir moléculas de ARN en la célula vegetal transgénica que subsecuentemente pueden formar moléculas de ARNs, como se describe, *más arriba*. Las moléculas de iARN expresadas en tejidos vegetales pueden ser ingeridas por una plaga de insectos para que se logre la supresión de la expresión del gen objetivo.
- Los elementos reguladores adicionales que opcionalmente pueden estar operativamente unidos a un ácido nucleico incluyen 5'UTRs ubicados entre un elemento promotor y un polinucleótido codificante que funciona como un elemento líder de traducción. El elemento líder de la traducción está presente en el ARNm completamente procesado, y puede afectar el procesamiento del transcrito primario, y/o la estabilidad del ARN. Los ejemplos de elementos líderes de la traducción incluyen los líderes de proteínas de choque térmico del maíz y petunia (patente de Estados Unidos 5,362,865), los líderes de la cubierta de virus de plantas, los líderes de rubisco de plantas, y otros. Véase, *por ejemplo*, Turner y Foster (1995) *Molecular Biotech.* 3(3):225-36. Los ejemplos no limitantes de 5'UTRs incluyen GmHsp (patente de Estados Unidos 5,659,122); PhDnaK (patente de Estados Unidos 5,362,865); AtAnt1; TEV (Carrington y Freed (1990) *J. Virol.* 64:1590-7); y AGRtunos (GenBank™ No. de acceso V00087; y Bevan y otros (1983) *Nature* 304:184-7).
- Los elementos reguladores adicionales que opcionalmente pueden estar operativamente unidos a un ácido nucleico también incluyen elementos 3' no traducidos, regiones de terminación de la transcripción 3' o regiones de poliadenilación. Estos son elementos genéticos ubicados aguas abajo de un polirribonucleótido, e incluyen polinucleótidos que proporcionan señales de poliadenilación, y/u otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción o el procesamiento del ARNm. La señal de poliadenilación funciona en plantas para causar la adición de nucleótidos de poliadenilato al extremo 3' del precursor de ARNm. El elemento de poliadenilación puede derivarse a partir de una variedad de genes de plantas, o de genes de ADN-T. Un ejemplo no limitante de una región de terminación de la transcripción 3' es la región 3' de nopalina sintasa (nos 3'; Fraley y otros (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 80:4803-7). Un ejemplo del uso de diferentes regiones 3' no traducidas se proporciona en Ingelbrecht y otros, (1989), *Plant Cell* 1:671-80. Los ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación incluyen una a partir de un gen de RbcS2 de *Pisum sativum* (Ps.RbcS2-E9; Coruzzi y otros (1984) *EMBO J.* 3:1671-9) y AGRtu.nos (GenBank™ No. de acceso E01312).
- Algunas modalidades pueden incluir un vector de transformación vegetal que comprende una molécula de ADN aislada y purificada que comprende al menos uno de los elementos reguladores descritos anteriormente unidos operativamente a uno o más polinucleótidos de la presente invención. Cuando se expresa, el uno o más polinucleótidos resultan en una o más molécula(s) de iARN que comprenden un polinucleótido que es específicamente complementario a todo o parte de una molécula de ARN nativo en una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). Por lo tanto, los polinucleótido(s) pueden comprender un segmento que codifica todo o parte de un polirribonucleótido presente dentro de un transcrito de ARN de plaga de coleópteros objetivo, y puede comprender repeticiones invertidas de todo o parte de un transcrito de plaga objetivo. Un vector de transformación vegetal puede contener polinucleótidos específicamente complementarios a más de un polinucleótido objetivo, por lo tanto, permite la producción de más de un ARNs para inhibir la expresión de dos o más genes en células de una o más poblaciones o especies de plagas de insectos objetivo. Los segmentos de polinucleótidos específicamente complementarios a los polinucleótidos presentes en diferentes genes pueden combinarse en una sola molécula de ácido nucleico compuesta para la expresión en una planta transgénica. Dichos segmentos pueden ser contiguos o separados por un separador.
- En algunas modalidades, un plásmido de la presente invención que ya contiene al menos un polinucleótido(s) de la invención puede modificarse mediante la inserción secuencial de polinucleótido(s) adicional(es) en el mismo plásmido, en donde los polinucleótido(s) adicional(es) están operativamente unidos a los mismos elementos reguladores como al menos un polinucleótido(s) original. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico puede diseñarse para la inhibición de múltiples genes objetivo. En algunas modalidades, los múltiples genes a inhibir pueden obtenerse a partir de la misma especie de plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero), que pueden mejorar la efectividad de la molécula de ácido nucleico. En otras modalidades, los genes pueden derivarse a partir de diferentes plagas de insectos, lo que puede ampliar el rango de plagas contra las cuales el(los) agente(s) son efectivo(s). Cuando se dirigen múltiples genes para la supresión o una combinación de expresión y supresión, se puede diseñar un elemento de ADN policistrónico.
- Una molécula de ácido nucleico recombinante o vector de la presente invención puede comprender un marcador de selección que confiere un fenotipo seleccionable a una célula transformada, tal como una célula vegetal. Los marcadores de selección pueden usarse, además, para seleccionar plantas o células vegetales que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención. El marcador puede codificar resistencia a biocidas, resistencia a antibióticos (*por ejemplo*, kanamicina, geneticina (G418), bleomicina, higromicina, *etc.*), o tolerancia a herbicidas (*por ejemplo*, glifosato, *etc.*). Los ejemplos de marcadores de selección incluyen, pero no se limitan a: un gen *neo* que codifica para resistencia a kanamicina y puede seleccionarse mediante el uso de kanamicina, G418, *etc.*; un gen *bar* que codifica resistencia a bialafos; un gen mutante de EPSP sintasa que codifica tolerancia a glifosato; un gen de *nitrilase* que confiere resistencia a bromoxinil; un gen mutante de acetolactato sintasa (*ALS*) que confiere tolerancia a imidazolinona o sulfonilurea; y un gen de *DHFR* de resistencia a metotrexato. Se dispone de múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloramfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina, espectinomina, rifampicina, estreptomina y tetraciclina, y similares. Los

ejemplos de tales marcadores de selección se ilustran, *por ejemplo*, patente de Estados Unidos 5,550,318; 5,633,435; 5,780,708 y 6,118,047.

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

20 En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico recombinante, como se describe, *más arriba*, puede usarse en métodos para la creación de plantas transgénicas y la expresión de ácidos nucleicos heterólogos en plantas para preparar plantas transgénicas que exhiben una susceptibilidad reducida a plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). Los vectores de transformación vegetal se pueden preparar, por ejemplo, al insertar moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de iARN en vectores de transformación vegetal e introducir estos en las plantas.

25 Los métodos adecuados para la transformación de células huésped incluyen cualquier método mediante el cual el ADN puede introducirse en una célula, tal como por transformación de protoplastos (*véase, por ejemplo*, patente de Estados Unidos 5,508,184); mediante la captación de ADN mediada por desecación/inhibición (*véase, por ejemplo*, Potrykus y otros (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:183-8), mediante electroporación (*véase, por ejemplo*, patente de Estados Unidos 5,384,253), mediante agitación con fibras de carburo de silicio (*véase, por ejemplo*, patentes de Estados Unidos 5,302,523 y 5,464,765), mediante transformación mediada por *Agrobacterium* (*véase, por ejemplo*, patente de Estados Unidos 5,563,055; 5,591,616; 5,693,512; 5,824,877; 5,981,840; y 6,384,301) y mediante aceleración de partículas recubiertas con ADN (*véase, por ejemplo*, patentes de Estados Unidos 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 el maíz se describen, por ejemplo, en Patentes de Estados Unidos 7,060,876 y 5,591,616; y publicación de patente internacional PCT WO95/06722. Mediante la aplicación de técnicas como estas, las células de prácticamente cualquier especie pueden transformarse de manera estable. En algunas modalidades, el ADN transformante se integra dentro del genoma de la célula huésped. En el caso de especies multicelulares, las células transgénicas pueden regenerarse en un organismo transgénico. Cualquiera de estas técnicas puede usarse para producir una planta transgénica, por ejemplo, que comprende uno o más ácidos nucleico que codifican uno o más moléculas de iARN en el genoma de la planta transgénica.

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

55 Por lo tanto, en algunas modalidades, un vector de transformación vegetal se deriva a partir de un plásmido Ti de *A. tumefaciens* (*véase, por ejemplo*, patentes de Estados Unidos 4,536,475, 4,693,977, 4,886,937, and 5,501,967; y patente Europea No. EP 0 122 791) or un plásmido Ri of *A. rhizogenes*. Otros vectores de transformación vegetal incluyen, por ejemplo y sin limitación, los descritos por Herrera-Estrelay otros (1983) *Nature* 303:209-13; Bevan y otros (1983) *Nature* 304:184-7; Klee y otros (1985) *Bio/Technol.* 3: 637-42; y en la patente Europea No. EP 0 120 516, y aquellos derivados a partir de cualquiera de los anteriores. Otras bacterias tales como *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, y *Mesorhizobium* que interactúan naturalmente con plantas pueden modificarse para mediar la transferencia génica a una serie de diversas plantas. Estas bacterias simbióticas asociadas a plantas pueden hacerse competentes para la transferencia génica mediante la adquisición de un plásmido Ti desarmado y un vector binario adecuado.

65 Después de proporcionar ADN exógeno a las células receptoras, las células transformadas se identifican generalmente para su cultivo posterior y la regeneración de plantas. Para mejorar la capacidad de identificar células transformadas, puede desearse emplear un gen selectivo o marcador que puede tamizarse, como se estableció anteriormente, con el vector de transformación usado para generar el transformante. En el caso en que se use un marcador de selección, las células transformadas se identifican dentro de la población de células potencialmente transformadas mediante la

exposición de las células a un agente o agentes de selección. En el caso en que se use un marcador que puede tamizarse, las células pueden tamizarse para detectar el rasgo del gen marcador deseado.

5 Las células que sobreviven a la exposición al agente de selección, o las células calificadas de positivas en un ensayo de tamizaje, pueden cultivarse en un medio que soporte la regeneración de las plantas. En algunas modalidades, cualquier medio de cultivo de tejidos vegetales adecuado (*por ejemplo*, los medios MS y N6) puede modificarse mediante la inclusión de sustancias adicionales, tales como reguladores del crecimiento. El tejido puede mantenerse en un medio básico con reguladores del crecimiento hasta disponer de tejido suficiente para comenzar los esfuerzos de regeneración de plantas, o después de rondas repetidas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración
10 (*por ejemplo*, al menos 2 semanas), después puede transferirse a los medios propicios para la formación de brotes. Los cultivos se transfieren periódicamente hasta que se haya producido suficiente formación de brotes. Una vez que se forman los brotes, se transfieren a los medios propicios para la formación de raíces. Una vez que se forman suficientes raíces, las plantas pueden transferirse al suelo para un mayor crecimiento y maduración.

15 Para confirmar la presencia de una molécula de ácido nucleico de interés (por ejemplo, un ADN que codifica una o más moléculas de iARN que inhiben la expresión del gen objetivo en una plaga de coleópteros) en las plantas en regeneración, se pueden realizar una serie de ensayos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo: ensayos de biología molecular, tales como southern y northern blot, PCR, y secuenciación de ácidos nucleicos; ensayos bioquímicos, tales como detección de la presencia de un producto proteico, *por ejemplo*, por medios inmunológicos (ELISA y/o western blot) o mediante la función
20 enzimática; ensayos de partes de plantas, tales como ensayos de hojas o raíces; y análisis del fenotipo de la planta regenerada completa.

25 Los eventos de integración pueden analizarse, por ejemplo, por amplificación por PCR mediante el uso de, *por ejemplo*, cebadores de oligonucleótidos 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) del ADNg derivado a partir del tejido calloso aislado de la planta huésped que se predice que contiene una molécula de ácido nucleico de interés integrada dentro del genoma, seguido de clonación estándar y análisis de secuencias de los productos de amplificación por PCR. Los métodos de genotipado por PCR se han descrito bien (por ejemplo, Rios, G. y otros (2002) Plant J. 32:243-53) y puede aplicarse al ADNg derivado a partir de cualquier especie vegetal (*por ejemplo*, *Z. mays* o
30 *Brassica napus*) o tipo de tejido, incluidos los cultivos celulares.

Una planta transgénica formada mediante el uso de métodos de transformación dependientes de *Agrobacterium* contiene típicamente un solo ADN recombinante insertado dentro de un cromosoma. El polinucleótido de un solo ADN recombinante es referido como un "evento transgénico" o "evento de integración". Dichas plantas transgénicas son heterocigotas para el polinucleótido exógeno insertado. En algunas modalidades, una planta transgénica homocigota con respecto a un
35 transgen puede obtenerse por apareamiento sexual consigo misma (autopolinización) de una planta transgénica segregante independiente que contiene un solo gen exógeno para sí mismo, por ejemplo, una planta T₀, para producir semilla T₁. La cuarta parte de la semilla T₁ producida será homocigota con respecto al transgen. La germinación de la semilla T₁ resulta en plantas que pueden probarse para determinar su heterocigosidad, típicamente mediante el uso de un ensayo SNP o un ensayo de amplificación térmica que permite la distinción entre heterocigotas y homocigotas (es
40 *decir*, un ensayo de cigosidad).

45 En modalidades particulares, se producen al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 más moléculas de iARN diferentes en una célula vegetal que tiene efecto inhibitorio de una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). Las moléculas de iARN (*por ejemplo*., moléculas de ARNs) pueden expresarse a partir de múltiples ácidos nucleicos introducidos en diferentes eventos de transformación, o de un solo ácido nucleico introducido en un solo evento de transformación. En algunas modalidades, una pluralidad de moléculas de iARN se expresan bajo el control de un solo promotor. En otras modalidades, una pluralidad de moléculas de iARN se expresan bajo el control de múltiples promotores. Se pueden expresar moléculas de iARN individuales que comprenden múltiples polinucleótidos que son homólogos a diferentes loci dentro de una o más plagas de insectos (por ejemplo, los loci definidos por las SEQ ID NOs: 1, 77, 84, 86, 88 y 93), ambos en diferentes poblaciones de la misma especie de plaga de insectos, o en diferentes especies de plagas de insectos.

55 Además de dirigir la transformación de una planta con una molécula de ácido nucleico recombinante, las plantas transgénicas pueden prepararse mediante el cruzamiento de una primera planta que tiene al menos un evento transgénico con una segunda planta que carece de un evento de este tipo. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de iARN puede introducirse en una primera línea vegetal que es susceptible de transformación para producir una planta transgénica, cuya planta transgénica puede cruzarse con una segunda línea vegetal para introducir el polinucleótido que codifica la molécula de iARN dentro la segunda línea vegetal.

60 En algunos aspectos, se incluyen semillas y productos básicos producidos por plantas transgénicas derivadas de células vegetales transformadas, en donde las semillas o productos básicos comprenden una cantidad detectable de un ácido nucleico de la invención. En algunas modalidades, tales productos básicos pueden producirse, por ejemplo, al obtener plantas transgénicas y preparar alimentos o piensos a partir de ellas. Los productos básicos que comprenden uno o más de los polinucleótidos de la invención incluyen, por ejemplo y sin limitación: harinas, aceites, granos triturados o enteros
65 o semillas de una planta, y cualquier producto alimenticio que comprenda cualquier harina, aceite o grano triturado o entero de una planta o semilla recombinante que comprende uno o más de los ácidos nucleicos de la invención. La

detección de uno o más de los polinucleótidos de la invención en uno o más productos o productos básicos es *de facto* evidencia de que el producto o producto básico se produce a partir de una planta transgénica diseñada para expresar una o más de las moléculas de iARN de la invención con el propósito de controlar plagas de insectos (*por ejemplo*, coleóptero).

5 En algunas modalidades, una planta o semilla transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención también puede comprender al menos otro evento transgénico en su genoma, que incluye, sin limitación: un evento transgénico a partir del cual se transcribe una molécula de iARN dirigida a un locus en una plaga de coleópteros que no sea de las definidas por las SEC ID NOs: 1, 77, 84, 86, 88 y 93, tal como, por ejemplo, uno o más loci seleccionados del grupo que consiste en Caf1-180 (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2012/0174258), VatpaseC (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2012/0174259), Rho1 (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2012/0174260), VatpaseH (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2012/0198586), PPI-87B (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2013/0091600), RPA70 (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2013/0091601), RPS6 (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2013/0097730), ROP (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 14/577,811), RNAPII140 (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 14/577,854), Dre4 (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 14/705,807), COPI *alpha* (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/063,199), COPI *beta* (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/063,203), COPI *gamma* (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/063,192), y COPI *delta* (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/063,216); un evento transgénico a partir del cual se transcribe una molécula de iARN dirigida a un gen en un organismo que no sea una plaga de coleópteros (*por ejemplo*, un nematodo parásito de la planta); un gen que codifica una proteína insecticida (*por ejemplo*, una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*); un gen de tolerancia a herbicidas (*por ejemplo*, un gen que proporciona tolerancia al glifosato); y un gen que contribuye a un fenotipo conveniente en la planta transgénica, tal como aumento del rendimiento, metabolismo de los ácidos grasos alterado o restauración de la esterilidad masculina citoplasmática. En modalidades particulares, los polinucleótidos que codifican moléculas de iARN de la invención pueden combinarse con otros rasgos de control y enfermedad de insectos en una planta para lograr los rasgos deseados para un control mejorado de enfermedad de plantas y daños de insectos. La combinación de rasgos de control de insectos que emplean modos de acción distintos puede proporcionar plantas transgénicas protegidas con durabilidad superior sobre las plantas que albergan un solo rasgo de control, por ejemplo, debido a la probabilidad reducida de que se desarrolle resistencia a los rasgo(s) en el campo.

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

A. Visión general

35 En algunas modalidades de la invención, al menos una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de insectos (*por ejemplo*, coleóptero) puede proporcionarse a una plaga de insectos, en donde la molécula de ácido nucleico conduce al silenciamiento génico mediado por ARNi en la plaga. En modalidades particulares, se puede proporcionar una molécula de iARN (hpARN) a una plaga de coleópteros. En algunas modalidades, se puede proporcionar una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de insectos a una plaga al poner en contacto la molécula de ácido nucleico con la plaga. En estas y otras modalidades, se puede proporcionar una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de insectos en un sustrato de alimentación de la plaga, por ejemplo, una composición nutricional. En estas y otras modalidades, se puede proporcionar una molécula de ácido nucleico útil para el control de una plaga de insectos a través de la ingestión de material vegetal que comprende la molécula de ácido nucleico que se ingiere por la plaga. En ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico está presente en el material vegetal a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante introducido dentro del material vegetal, por ejemplo, mediante la transformación de una célula vegetal con un vector que comprende el ácido nucleico recombinante y la regeneración de un material vegetal o planta entera a partir de la célula vegetal transformada.

B. Supresión del gen objetivo mediada por ARNi

50 En modalidades, la invención proporciona moléculas de iARN (hpARN) que pueden diseñarse para dirigirse a polinucleótidos nativos esenciales (*por ejemplo*, genes esenciales) en el transcriptoma de una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de coleópteros (*por ejemplo*, WCR, NCR, SCR y *Meligethes aeneus*)), por ejemplo, al diseñar una molécula de iARN que comprende al menos una cadena que comprende un polinucleótido que es específicamente complementario al polinucleótido objetivo. La secuencia de una molécula de iARN así diseñada puede ser idéntica a la del polinucleótido objetivo, o puede incorporar discordancias que no impiden la hibridación específica entre la molécula de iARN y su polinucleótido objetivo.

60 Las moléculas de iARN de la invención pueden usarse en métodos para la supresión génica en una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero), al reducir, de esta manera, el nivel o la incidencia de daño causado por la plaga en una planta (por ejemplo, una planta transformada protegida que comprende una molécula de iARN). Como se usa en la presente descripción, el término "supresión génica" se refiere a cualquiera de los métodos bien conocidos para reducir los niveles de proteína producidos como resultado de la transcripción génica en ARNm y la traducción posterior del ARNm, incluida la reducción de la expresión de proteínas a partir de un gen o un polinucleótido codificante que incluye inhibición postranscripcional de la expresión y supresión transcripcional. La inhibición postranscripcional está mediada por homología específica entre todo o parte de un ARNm transcrito a partir de un gen dirigido a la supresión y la

correspondiente molécula de iARN usada para la supresión. Adicionalmente, la inhibición postranscripcional se refiere a la reducción sustancial y medible de la cantidad de ARNm disponible en la célula para la unión por ribosomas.

5 En modalidades, la molécula de ARNs puede ser escindida por la enzima, DICER, en moléculas cortas de siARN (aproximadamente 20 nucleótidos de longitud). La molécula de siARN bicatenaria generada por la actividad de DICER sobre la molécula de ARNs puede separarse en dos siARNs monocatenarios; la "cadena de pasajeros" y la "cadena guía". La cadena de pasajeros puede degradarse y la cadena guía puede incorporarse a RISC. La inhibición postranscripcional se produce por hibridación específica de la cadena guía con un polinucleótido específicamente complementario de una molécula de ARNm, y la subsecuente escisión por la enzima Argonaute (componente catalítico del complejo RISC).

15 Se describe el uso de cualquier forma de molécula de iARN. Los expertos en la técnica entenderán que las moléculas de ARNs son típicamente más estables durante la preparación y durante la etapa de proporcionar la molécula de iARN a una célula que las moléculas de ARN monocatenario, y típicamente también son más estables en una célula. Por lo tanto, mientras que las moléculas de siARN y miARN, por ejemplo, pueden ser igualmente efectivas, se puede elegir una molécula de ARNs debido a su estabilidad.

20 En modalidades particulares, se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido, cuyo polinucleótido puede expresarse *in vitro* para producir una molécula de iARN que sea sustancialmente homóloga a una molécula de ácido nucleico codificada por un polinucleótido dentro del genoma de una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). En modalidades, la molécula de iARN transcrita *in vitro* es una molécula de ARNs estabilizada que comprende una estructura de tallo-lazo. Después de que una plaga de insectos contacta a la molécula de iARN transcrita *in vitro*, puede producirse inhibición postranscripcional de un gen objetivo en la plaga (*por ejemplo*, un gen esencial).

25 En algunas modalidades de la invención, la expresión de una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido se usa en un método para la inhibición postranscripcional de un gen objetivo en una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero), en donde el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en: la SEQ ID NO:84; el complemento de la SEQ ID NO:84, la SEQ ID NO:86; el complemento de la SEQ ID NO:86, la SEQ ID NO:88; el complemento de la SEQ ID NO:88; la SEQ ID NO:90; el complemento de la SEQ ID NO:90; la SEQ ID NO:93; el complemento de la SEQ ID NO:93; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:84; el complemento de un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:84; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:86; el complemento de un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:86; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:88; el complemento de un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:88; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:90; el complemento de un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:90; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:93; el complemento de un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:93; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:84; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:84; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:86; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:86; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:88; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:88; un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:90; el complemento de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:90; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:84; el complemento de un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:84; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:86; el complemento de un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:86; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:88; el complemento de un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:88; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:90; el complemento de un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:90; un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:93; el complemento de un fragmento de al menos 50 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificante nativo de un organismo *Meligethes* que comprende la SEQ ID NO:93. En ciertas modalidades, la expresión de una molécula de ácido nucleico que es al menos alrededor de 80 % idéntica (*por ejemplo*, 79 %, alrededor de 80 %, alrededor de 81 %, alrededor de 82 %, alrededor de 83 %, alrededor de 84 %, alrededor de 85 %, alrededor de 86 %, alrededor de 87 %, alrededor de 88 %, alrededor de 89 %, alrededor de 90 %, alrededor de 91 %, alrededor de 92 %, alrededor de 93 %, alrededor de 94 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 %, alrededor de 100 % y 100 %) pueden usarse con cualquiera de los anteriores. En estas y otras modalidades, se puede expresar una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente con una molécula de ARN presente en al menos una célula de una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero).

Es una característica importante de algunas modalidades en la presente descripción que el sistema de inhibición postranscripcional de ARNi es capaz de tolerar variaciones de secuencia entre genes objetivo que podrían esperarse debido a mutación genética, polimorfismo de cepa o divergencia evolutiva. La molécula de ácido nucleico introducida no necesita ser absolutamente homóloga a un producto de transcripción primario o a un ARNm completamente procesado de un gen objetivo, siempre que la molécula de ácido nucleico introducida sea específicamente hibridable a un producto de transcripción primario o a un ARNm completamente procesado del gen objetivo. Además, la molécula de ácido nucleico introducida puede no necesitar ser de longitud completa, con relación a un producto de transcripción primario o un ARNm completamente procesado del gen objetivo.

La inhibición de un gen objetivo mediante el uso de la tecnología de iARN de la presente invención es específica de secuencia; es decir, polinucleótidos sustancialmente homólogos a la(s) molécula(s) de iARN están dirigidos a la inhibición genética. En algunas modalidades, una molécula de ARN que comprende un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la de una porción de un gen objetivo puede usarse para la inhibición. En estas y otras modalidades, puede usarse una molécula de ARN que comprende un polinucleótido con una o más mutaciones de inserción, delección y/o puntuales con relación a a un polinucleótido objetivo. En modalidades particulares, una molécula de iARN y una porción de un gen objetivo pueden compartir, por ejemplo, al menos de aproximadamente 80 %, al menos de aproximadamente 81 %, al menos de aproximadamente 82 %, al menos de aproximadamente 83 %, al menos de aproximadamente 84 %, al menos de aproximadamente 85 %, al menos de aproximadamente 86 %, al menos de aproximadamente 87 %, al menos de aproximadamente 88 %, al menos de aproximadamente 89 %, al menos de aproximadamente 90 %, al menos de aproximadamente 91 %, al menos de aproximadamente 92 %, al menos de aproximadamente 93 %, al menos de aproximadamente 94 %, al menos de aproximadamente 95 %, al menos de aproximadamente 96 %, al menos de aproximadamente 97 %, al menos de aproximadamente 98 %, al menos de aproximadamente el 99 %, al menos de aproximadamente el 100 % y 100 % de identidad de secuencia. Alternativamente, la región dúplex de una molécula de ARNs puede ser específicamente hibridable con una porción de un transcrito del gen objetivo. En moléculas específicamente hibridables, un polinucleótido de longitud inferior a la completa que exhibe una mayor homología compensa un polinucleótido más largo y menos homólogo. La longitud del polinucleótido de una región dúplex de una molécula de ARNs que es idéntica a una porción de un transcrito del gen objetivo puede ser de al menos alrededor de 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o al menos alrededor de 1000 bases. En algunas modalidades, puede usarse un polinucleótido de más de 50-100 nucleótidos. En modalidades particulares, puede usarse un polinucleótido de más de alrededor de 200-300 nucleótidos. En modalidades particulares, puede usarse un polinucleótido de más de alrededor de 500-1000 nucleótidos, en dependencia del tamaño del gen objetivo.

En ciertas modalidades, la expresión de un gen objetivo en una plaga de insectos (*por ejemplo*, una plaga de insectos coleópteros) puede inhibirse al menos en un 10 %; al menos 33 %; al menos 50 %; o al menos 80 % dentro de una célula de la plaga, de manera que tenga lugar una inhibición significativa. La inhibición significativa se refiere a la inhibición por encima de un umbral que resulta en un fenotipo detectable (*por ejemplo*, cese del crecimiento, cese de la alimentación, cese del desarrollo, mortalidad inducida, etc.), o una disminución detectable en el ARN y/o el producto génico correspondiente al gen objetivo que se inhibe. Aunque, en ciertas modalidades de la invención, la inhibición ocurre sustancialmente en todas las células de la plaga, en otras modalidades la inhibición ocurre solo en un subconjunto de células que expresan el gen objetivo.

En algunas modalidades, la supresión transcripcional está mediada por la presencia en una célula de una molécula de ARNs que exhibe una identidad de secuencia sustancial con un ADN promotor o el complemento de este para efectuar lo que es referido como una "supresión trans del promotor." La supresión génica puede ser efectiva contra genes objetivo en una plaga de insectos que pueden ingerir o contactar tales moléculas de ARNs, por ejemplo, al ingerir o poner en contacto con tal material vegetal que contiene las moléculas de ARNs. Las moléculas de ARNs para uso en la supresión trans del promotor pueden diseñarse específicamente para inhibir o suprimir la expresión de uno o más polinucleótidos homólogos o complementarios en las células de la plaga de insectos. La supresión génica postranscripcional por ARN orientado al sentido o antisentido para regular la expresión génica en células vegetales se describe en las patentes de Estados Unidos 5,107,065; 5,759,829; 5,283,184; and 5,231,020.

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

La expresión de moléculas de iARN para la inhibición génica mediada por ARNi en una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero) se puede llevar a cabo en cualquiera de muchos formatos *in vitro* o *in vivo*. Las moléculas de iARN se pueden proporcionar a una plaga de insectos, por ejemplo, al poner en contacto las moléculas de iARN con la plaga, o al hacer que la plaga ingiera o de cualquier otra manera internalice las moléculas de iARN. Algunas modalidades incluyen plantas 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 iARN, por ejemplo, bajo el control de un promotor heterólogo, para proporcionar un efecto protector de plagas. Por lo tanto, cuando una planta transgénica o célula vegetal es consumida por una plaga de insectos durante la alimentación, la plaga puede ingerir moléculas de iARN expresadas en las células o plantas transgénicas. Los polinucleótidos de la presente invención también pueden introducirse en una amplia variedad de huéspedes de microorganismos procariotas y eucariotas para producir moléculas de iARN. El término "microorganismo" incluye especies procariotas y eucariotas, tales como bacterias y hongos.

La modulación de la expresión génica puede incluir la supresión parcial o completa de dicha expresión. En otra modalidad, un método para la supresión de la expresión génica en una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero) comprende proporcionar en el tejido del huésped de la plaga una cantidad supresora de genes de al menos una molécula de ARNds formada después de la transcripción de un polinucleótido como se describe en la presente descripción, al menos un segmento del cual es complementario a un ARNm dentro de las células de la plaga de insectos. Una molécula de hpARN, ingerida por una plaga de insectos puede ser al menos de aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o alrededor de 100 % idéntico a una molécula de ARN transcrita a partir de una molécula de ADN *ncm*, por ejemplo, que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 84, 86, 88, 90, y 93. En particular, una molécula de hpARN, ingerida por una plaga de insectos puede ser al menos de aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o alrededor de 100 % idéntico a una molécula de ARN transcrita a partir de un polinucleótido de acuerdo con la SEC ID NO: 84. En particular, una molécula de hpARN, ingerida por una plaga de insectos puede ser al menos de aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o alrededor de 100 % idéntico a una molécula de ARN transcrita a partir de un polinucleótido de acuerdo con la SEC ID NO:86. En particular, una molécula de hpARN, ingerida por una plaga de insectos puede ser al menos de aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o alrededor de 100 % idéntico a una molécula de ARN transcrita a partir de un polinucleótido de acuerdo con la SEC ID NO: 88. En particular, la molécula de hpARN, ingerida por una plaga de insectos puede ser al menos de aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o alrededor de 100 % idéntico a una molécula de ARN transcrita a partir de un polinucleótido de acuerdo con la SEC ID NO:90. En particular, una molécula de hpARN, ingerida por una plaga de insectos puede ser al menos de aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o alrededor de 100 % idéntico a una molécula de ARN transcrita a partir de un polinucleótido de acuerdo con la SEC ID NO:93. Se proporcionan, por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas y sustancialmente purificadas que incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos de origen no natural y constructos de ADN recombinante para proporcionar moléculas de ARNds, que suprimen o inhiben la expresión de un polinucleótido codificante endógeno o un polinucleótido codificante objetivo en una plaga de insectos cuando se les presenta.

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

Para impartir resistencia a plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero) a una planta transgénica, una molécula de ADN recombinante puede, por ejemplo, transcribirse en una molécula de iARN, tal como una molécula de ARNds, una molécula de siARN, una molécula de miARN, una molécula de shARN o una molécula de hpARN. En algunas modalidades, una molécula de ARN transcrita a partir de una molécula de ADN recombinante puede formar una molécula de ARNds dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante. Dicha molécula de ARNds puede estar compuesta en parte de un polinucleótido que es idéntico a un polinucleótido correspondiente transcrito a partir de un ADN dentro de una plaga de insectos de un tipo que puede infestar la planta huésped. La expresión de un gen objetivo dentro de la plaga es suprimida por la molécula de ARNds, y la supresión de la expresión del gen objetivo en la plaga resulta en que la planta transgénica sea resistente a la plaga. Se ha demostrado que los efectos moduladores de las moléculas de ARNds son aplicables a una variedad de genes expresados en plagas, que incluyen, por ejemplo, genes endógenos responsables del metabolismo celular o la transformación celular, incluidos genes de limpieza; factores de transcripción; genes relacionados con la muda; y otros genes que codifican polipéptidos involucrados en el metabolismo celular o en el crecimiento y desarrollo normal.

Para la transcripción de un transgen *in vivo* o un constructo de expresión, una región reguladora (*por ejemplo*, promotor, potenciador, silenciador y señal de poliadenilación) pueden usarse en algunas modalidades para transcribir la cadena de ARN (o cadenas). Por lo tanto, en algunas modalidades, como se establece, *más arriba*, un polinucleótido para usar en la producción de moléculas de iARN puede estar operativamente unido a uno o más elementos promotores funcionales en una célula huésped de planta. El promotor puede ser un promotor endógeno, normalmente residente en el genoma huésped. El polinucleótido de la presente invención, bajo el control de un elemento promotor operativamente unido, puede estar flanqueado además por elementos adicionales que afectan ventajosamente su transcripción y/o la estabilidad del transcripto resultante. Dichos elementos pueden ubicarse aguas arriba del promotor operativamente unido, aguas abajo del extremo 3' del constructo de expresión, y pueden ocurrir aguas arriba del promotor y aguas abajo del extremo 3' del constructo de expresión.

Algunas modalidades proporcionan métodos para reducir el daño a una planta huésped (*por ejemplo*, una planta de maíz o una planta de canola) causada por una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero) que se alimenta de la planta, en donde el método comprende proporcionar en la planta huésped una célula vegetal transformada que expresa al menos una molécula de ácido nucleico de la invención, en donde la(s) molécula(s) de ácido nucleico funciona(n) tras ser absorbida(s) por la(s) plaga(s) para inhibir la expresión de un polinucleótido objetivo dentro de la(s) plaga(s), cuya inhibición de la expresión resulta en mortalidad y/o crecimiento reducido de la(s) plaga(s), lo que reduce de esta manera el daño a la planta huésped causado por la(s) plaga(s). En algunas modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico comprenden moléculas de ARNs. En estas y otras modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico comprenden moléculas de ARNs que comprenden cada una más de un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros. En algunas modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico consiste(n) en un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de insectos.

En algunas modalidades, se proporciona un método para aumentar el rendimiento de un cultivo de maíz, en donde el método comprende introducir en una planta de maíz al menos una molécula de ácido nucleico de la invención; cultivar la planta de maíz para permitir la expresión de una molécula de iARN que comprende el ácido nucleico, en donde la expresión de una molécula de iARN que comprende el ácido nucleico inhibe el daño y/o crecimiento de plagas de insectos (*por ejemplo*, coleóptero), lo que reduce o elimina de esta manera una pérdida del rendimiento debido a la infestación de plagas. En modalidades, la molécula de iARN es una molécula de ARNs. En estas y otras modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico comprende(n) moléculas de ARNs que comprenden cada una más de un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de insectos. En algunos ejemplos, la(s) molécula(s) de ácido nucleico comprende(n) un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros.

En algunas modalidades, se proporciona un método para modular la expresión de un gen objetivo en una plaga de insectos (*por ejemplo*, coleóptero), el método comprende: transformar una célula vegetal con un vector que comprende un polinucleótido que codifica al menos una molécula de iARN de la invención, en donde el polinucleótido está unido operativamente a un promotor y un elemento de terminación de la transcripción; cultivar la célula vegetal transformada en condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo celular vegetal que incluye una pluralidad de células vegetales transformadas; seleccionar células vegetales transformadas que han integrado el polinucleótido en sus genomas; tamizar las células vegetales transformadas para la expresión de una molécula de iARN codificada por el polinucleótido integrado; seleccionar una célula vegetal transgénica que expresa la molécula de iARN; y alimentar con la célula vegetal transgénica seleccionada a la plaga de insectos. Las plantas también pueden regenerarse a partir de células vegetales transformadas que expresan una molécula de iARN codificada por la molécula de ácido nucleico integrada. En modalidades, la molécula de iARN es una molécula de ARNs. En estas y otras modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico comprende(n) moléculas de ARNs que comprenden cada una más de un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de insectos. En algunos ejemplos, la(s) molécula(s) de ácido nucleico comprende(n) un polinucleótido que es específicamente hibridable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros.

Las moléculas de iARN de la invención pueden incorporarse dentro de las semillas de una especie de planta (*por ejemplo*, maíz o canola), ya sea como un producto de expresión de un gen recombinante incorporado en un genoma de las células vegetales, o incorporado en un recubrimiento o tratamiento semilla que se aplica a la semilla antes de plantar. Una célula vegetal que comprende un gen recombinante se considera un evento transgénico. También se incluyen en modalidades de la invención los sistemas de suministro para el suministro de moléculas de iARN a plagas de insectos (*por ejemplo*, coleóptero). *Por ejemplo*, las moléculas de iARN de la invención pueden introducirse directamente dentro de las células de una plaga(s). Los métodos para la introducción pueden incluir la mezcla directa de iARN con tejido vegetal de un huésped para la(s) plaga(s) del insecto, así como también la aplicación de composiciones que comprenden moléculas de iARN de la invención al tejido de la planta huésped. *Por ejemplo*, las moléculas de iARN se pueden rociar sobre la superficie de una planta. Alternativamente, una molécula de iARN puede ser expresada por un microorganismo, y el microorganismo puede aplicarse sobre la superficie de la planta, o introducirse en una raíz o tallo por medios físicos tales como una inyección. Como se discutió, *más arriba*, una planta transgénica también puede ser modificada genéticamente para expresar al menos una molécula de iARN en una cantidad suficiente para matar las plagas de insectos que se sabe que infestan la planta. Las moléculas de iARN producidas por síntesis química o enzimática también pueden formularse de manera consistente con las prácticas agrícolas comunes, y usarse como productos en aerosol para controlar el daño a las plantas por una plaga de insectos. Las formulaciones pueden incluir los adhesivos y humectantes apropiados requeridos para una cobertura foliar eficiente, así como también protectores UV para proteger las moléculas de iARN (*por ejemplo*, moléculas de ARNs) del daño de los rayos UV. Dichos aditivos se usan comúnmente en la industria de bioinsecticidas, y se conocen bien por los expertos en la técnica. Dichas aplicaciones pueden combinarse con otras aplicaciones de insecticidas en aerosol (de base biológica o de cualquier otra manera) para mejorar la protección de las plantas de las plagas.

Todas las referencias, que incluyen publicaciones, solicitudes de patentes y patentes, citadas en la presente descripción se incorporan por referencia en la medida en que no sean inconsistentes con los detalles explícitos de esta divulgación y se incorporan de la misma manera que si cada referencia se indicara individual y específicamente para ser incorporada por referencia y se establezca en su totalidad en la presente descripción. Las publicaciones discutidas en la presente

descripción se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente descripción debe interpretarse como una aceptación de que los inventores no tienen derecho a antedatar dicha descripción en virtud de invención previa.

5 Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar determinadas características y/o aspectos particulares. Estos ejemplos no deben considerarse que limitan la descripción a las características o aspectos particulares descritos.

EJEMPLOS

10 Ejemplo 1: Materiales y Métodos

Preparación de muestras y bioensayos.

15 Una serie de moléculas de ARNs (incluidas aquellas correspondientes a *ncm* reg1 (SEQ ID NO:3), *ncm* reg2 (SEQ ID NO:4), *ncm* v1 (SEQ ID NO:5), y *ncm* v2 (SEQ ID NO:6) se sintetizaron y purificaron mediante el uso de un MEGASCRIP[®] RNAi Kit o HiScribe[®] T7 In Vitro Transcription Kit. Las moléculas de ARNs 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 inhibición del crecimiento del WCR (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Las concentraciones de moléculas de ARNs en el tampón del bioensayo se midieron mediante el uso de un espectrofotómetro NANODROP[™] 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE).

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

25 Los bioensayos se realizaron en bandejas de plástico de 128 pozos específicamente diseñadas 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. Una alícuota de 60 µL de muestra de ARNs fue suministrada por pipeta sobre la superficie de la dieta de cada pocillo (40 µL/cm²). Las concentraciones de la muestra de ARNs se calcularon como la cantidad de ARNs por centímetro cuadrado (ng/cm²) del área superficial (1,5 cm²) en el pozo. Las bandejas tratadas se mantuvieron en una campana extractora hasta que el líquido en la superficie de la dieta se evaporó o fue absorbido dentro de la dieta.

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

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

45 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 los 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).

50 El análisis estadístico se realizó mediante el uso del software JMP[™] (SAS, Cary, NC).

La CL₅₀(concentración letal) se define como la dosis a la que se mata el 50 % de los insectos de la prueba. El GI₅₀(GI, por sus siglas en inglés) (inhibición del crecimiento) se define como la dosis a la que el crecimiento medio (*por ejemplo*, peso vivo) de los insectos de la prueba es el 50 % del valor medio visto en las muestras de verificación de antecedentes.

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

60 Ejemplo 2: Identificación de genes objetivo candidatos

Múltiples etapas del desarrollo del WCR (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) se seleccionaron para el análisis de transcriptoma agrupado para proporcionar secuencias de genes objetivo candidatas para el control mediante la tecnología de resistencia a insectos de plantas transgénicas de ARNi.

En un ejemplo, el ARN total se aisló de aproximadamente 0,9 g de larvas del WCR completas del primer estadio; (4 a 5 días después de la eclosión; mantenido a 16 °C) y purificado mediante el uso del siguiente método basado en fenol/TRI REAGENT® (CENTRO DE INVESTIGACIÓN MOLECULAR, Cincinnati, OH):

5 Las larvas se homogeneizaron a temperatura ambiente en un homogeneizador de 15 mL con 10 mL de TRI REAGENT® hasta que se obtuvo una suspensión homogénea. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, el homogeneizado se dispuso en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL (1 mL por tubo), se añadieron 200 µL de cloroformo y la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Después de dejar que la extracción reposara a temperatura ambiente durante 10 minutos, las fases se separaron por centrifugación a 12 000 x g a 4 °C. La fase superior (que comprende alrededor de 0,6 mL) se transfirió cuidadosamente a otro tubo estéril de 1,5 mL y se añadió un volumen igual de isopropanol a temperatura ambiente. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos, la mezcla se centrifugó 8 minutos a 12 000 x g (4 °C o 25 °C).

15 El sobrenadante se retiró cuidadosamente y se desechó, y el sedimento de ARN se lavó dos veces mediante agitación vorticial con etanol al 75 %, con recuperación por centrifugación durante 5 minutos a 7500 x g (4 °C o 25 °C) después de cada lavado. El etanol se retiró cuidadosamente, el sedimento se dejó secar al aire durante 3 a 5 minutos, y luego se disolvió en agua estéril libre de nucleasas. La concentración de ARN se determinó mediante la medición de la absorbancia (A) a 260 nm y 280 nm. Una extracción típica de aproximadamente 0,9 g de larvas produjo más de 1 mg de ARN total, con una relación de A_{260}/A_{280} de 1,9. El ARN, por lo tanto, extraído se almacenó a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

20 La calidad del ARN se determinó al correr una alícuota a través de un gel de agarosa al 1 %. La solución de gel de agarosa se preparó mediante el uso de tampón TAE 10x en autoclave (EDTA con Tris-acetato; la concentración 1x es Tris-acetato 0,04 M, EDTA 1 mM (sal sódica de ácido etilenediaminotetraacético sal sódica), pH 8,0) diluido con agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) en un contenedor autoclavado. Se usó TAE 1x como tampón de corrida. Antes de su uso, el tanque de electroforesis y el peine formador de pozos se limpiaron con RNaseAway™ (INVITROGEN INC., Carlsbad, CA). Se mezclaron dos µL de muestra de ARN con 8 µL de tampón TE (Tris HCl 10 mM pH 7,0; EDTA 1 mM) y 10 µL de tampón de muestra de ARN (NOVAGEN® Catálogo No 70606; EMD4 Bioscience, Gibbstown, NJ). La muestra se calentó a 70 °C durante 3 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y se cargaron por pocillo 5 µL (que contienen de 1 µg a 2 µg de ARN). Los marcadores de peso molecular de ARN disponibles comercialmente se corrieron simultáneamente en pocillos separados para la comparación del tamaño molecular. El gel se corrió a 60 volts por 2 horas.

35 Un proveedor de servicios comerciales (EUROFINS MWG Operon, Huntsville, AL) preparó una biblioteca de ADNc normalizada a partir del ARN total de las larvas, mediante el uso de cebadores aleatorios. La biblioteca de ADNc de larvas normalizada fue secuenciada a escala de 1/2 placa por la química de la 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 cóntigos. Tanto las lecturas sin ensamblar como los cóntigos se convirtieron en bases de datos BLASTable mediante el uso del programa disponible públicamente, FORMATDB (disponible de NCBI).

40 Las bibliotecas de ARN total y ADNc normalizado se prepararon de manera similar a partir de materiales cosechados en otras etapas de desarrollo del WCR. Se construyó una biblioteca de transcriptoma agrupada para el tamizaje del gen objetivo mediante la combinación de miembros de la biblioteca de ADNc que representan las diversas etapas de desarrollo.

45 Los genes candidatos para el ARNi dirigido se seleccionaron mediante el uso de información respecto a los efectos letales del ARNi de genes particulares en otros insectos tales como *Drosophila* y *Tribolium*. Se hipotetiza que estos genes son esenciales para la supervivencia y el crecimiento de los insectos coleópteros. Los homólogos de genes objetivo seleccionados se identificaron en la base de datos de secuencia del transcriptoma como se describe más abajo. Las secuencias de longitud completa o parciales de los genes objetivo se amplificaron por PCR para preparar moldes para la producción de ARN bicatenario (ARNds).

50 Se corrieron búsquedas de TBLASTN mediante el uso de secuencias codificantes de proteínas candidatas contra bases de datos de BLASTable que contienen lecturas de secuencia no ensambladas de *Diabrotica* o los cóntigos ensamblados. Se confirmaron aciertos significativos a una secuencia de *Diabrotica* (definida como mejor que e^{-20} para homologías de cóntigos y mejor que e^{-10} para homologías de lecturas de secuencias sin ensamblar) mediante el uso de BLASTX contra la base de datos no redundante NCBI. Los resultados de esta búsqueda de BLASTX confirmaron que las secuencias génicas candidatas homólogas de *Diabrotica* identificadas en la búsqueda TBLASTN de hecho comprendieron genes de *Diabrotica*, o fueron el mejor acierto para la secuencia génica candidata no-*Diabrotica* presente en las secuencias *Diabrotica*. En algunos casos, estaba claro que algunos de los cóntigos de *Diabrotica* o lecturas de secuencias sin ensamblar seleccionadas por homología a un gen candidato no-*Diabrotica* se solapaban, y que el ensamblaje de los cóntigos no había logrado unir estos solapamientos. En esos casos, se usó Sequencher™ v4.9 (GENE CODES CORPORATION, Ann Arbor, MI) para ensamblar las secuencias en cóntigos más largos.

60 Un gen objetivo candidato que codifica *Diabrotica ncm* (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:77) se identificó como un gen que puede provocar mortalidad de plaga de coleópteros, inhibición del crecimiento o inhibición del desarrollo en el WCR.

65

Los transgenes de ARNs *Ncm* se pueden combinar con otras moléculas de ARNs para proporcionar direccionamiento de ARNi redundantes y efectos de ARNi sinérgicos. Los eventos de maíz transgénico que expresan ARNs que se dirigen a *ncm* son útiles para prevenir el daño de alimentación de raíz por el gusano de la raíz del maíz. Los transgenes de ARNs *Ncm* representan nuevos modos de acción para combinar con la tecnología de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* en pirámides génicas de gestión de resistencia a los insectos para mitigar el desarrollo de poblaciones del gusano de la raíz resistentes a cualquiera de estas tecnologías de control del gusano de la raíz.

Los clones completos o parciales de secuencias de un gen candidato de *Diabrotica*, en la presente descripción referido como *ncm*, se usaron para generar amplicones de PCR para la síntesis de ARNs.

Ejemplo 3: Amplificación de genes objetivo para producir ARNs

Los cebadores se diseñaron para amplificar porciones de regiones codificantes de cada gen objetivo por PCR. Véase Tabla 1. Donde fue apropiado, se incorporó una secuencia promotora de fago T7 (TTAATACGACTCACTATAGGGAGA; SEQ ID NO:7) en los extremos 5' de las cadenas sentido o antisentido amplificadas. Véase Tabla 1. El ARN total se extrajo del WCR mediante el uso de TRIzol® (Life Technologies, Grand Island, NY), donde las larvas y los adultos del WCR se homogeneizaron a temperatura ambiente en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL con 1 mL de TRIzol® mediante el uso de un mezclador de mortero de motor (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL) hasta que se obtuvo una suspensión homogénea. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, el homogeneizado se centrifugó para eliminar los restos celulares y 1 mL del sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se añadieron 200 µL de cloroformo y la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Después de dejar que la extracción reposara a temperatura ambiente durante 2-3 minutos, las fases se separaron por centrifugación a 12 000 x g a 4 °C. La fase superior (que comprende alrededor de 0,6 mL) se transfirió cuidadosamente a otro tubo estéril de 1,5 mL y se añadieron 500 µL de isopropanol a temperatura ambiente. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos, la mezcla se centrifugó 10 minutos a 12 000 x g a 4 °C. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y se desechó, y el sedimento de ARN se lavó dos veces mediante agitación vorticial con etanol al 75 %, con recuperación por centrifugación durante 5 minutos a 7500 x g (4 °C o 25 °C) después de cada lavado. El etanol se retiró cuidadosamente, el sedimento se dejó secar al aire durante 3 a 5 minutos, y luego se disolvió en agua estéril libre de nucleasas.

Luego se usó el ARN total para hacer la primera cadena de ADNc con SuperScriptIII® First-Strand Synthesis System y las instrucciones de cebado de los fabricantes de Oligo dT (Life Technologies, Grand Island, NY). Esta primera cadena de ADNc se usó como molde para reacciones de PCR mediante el uso de cebadores opuestos posicionados para amplificar toda o parte de la secuencia del gen objetivo nativo. El ARNs también se amplificó a partir de un clon de ADN que comprende la región codificante para una proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEQ ID NO:8; Shagin y otros (2004) Mol. Biol. Evol. 21(5):841-50).

Tabla 1. Cebadores y pares de cebadores usados para amplificar porciones de regiones codificantes del gen objetivo ilustrativo *ncm* y el gen de control negativo YFP.

	ID del gen	ID del cebador	Secuencia
Par 1	<i>ncm</i> reg 1	Dvv_ncm-1-411	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCTGCGTA AACGTTTGTAAG (SEQ ID NO:9)
		Dvv_ncm-1-411_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGATGCGGCT CCCGAAGAATCTG (SEQ ID NO:10)
Par 2	<i>ncm</i> reg2	Dvv_ncm-2-407_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTAGCATC TAGTCTGTGAGTGG (SEQ ID NO:11)
		Dvv_ncm-2-407_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCTTAGTA AAGAAATCTTAGGCAG (SEQ ID NO:12)

	ID del gen	ID del cebador	Secuencia	
5	Par 3	<i>ncm</i> v1	Dvv_ <i>ncm</i> -1v1_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGATTAATGTAA CCATGAACGGATTC (SEQ ID NO:13)
10			Dvv_ <i>ncm</i> -1v1_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACAGTCATCA AACCAAGAGAAAG (SEQ ID NO:14)
15	Par 4	<i>ncm</i> v2	Dvv_ <i>ncm</i> -1v2_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCTGCGTA AACGTTTGTAAG (SEQ ID NO:15)
20			Dvv_ <i>ncm</i> -1v2_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAATTGGCATC ATCGCCAGAGAATTATTG (SEQ ID NO:16)
25	Par 5	YFP	YFP-F_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACACCATGGG CTCCAGCGGCGCCC (SEQ ID NO:27)
30			YFP-R T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGATCTTGA AGGCGCTCTTCAGG (SEQ ID NO:30)

Ejemplo 4: Constructos de ARNi

Preparación de moldes por PCR y síntesis de ARNs.

Una estrategia usada para proporcionar moldes específicos para la producción de ARNs de *ncm* y YFP se muestra en la figura 1. Los ADNs moldes destinados para usar en la síntesis de ARNs de *ncm* se prepararon por PCR mediante el uso de los pares de cebadores en la tabla 1 y (como molde de PCR) primera cadena de ADNc preparada a partir de ARN total aislado de huevos WCR, larvas de primer estadio o adultos. Para cada región del gen objetivo seleccionado *ncm* y YFP, las amplificaciones por PCR introdujeron una secuencia promotora de T7 en los extremos 5' de las cadenas sentido y antisentido amplificadas (el segmento YFP se amplificó a partir de un clon de ADN de la región codificante YFP). Los dos fragmentos amplificados por PCR para cada región de los genes objetivo se mezclaron en cantidades aproximadamente iguales, y la mezcla se usó como molde de transcripción para la producción de ARNs. Véase figura 1. Las secuencias de los moldes de ARNs amplificados con los pares de cebadores particulares fueron: SEQ ID NO:3 (*ncm* reg1), SEQ ID NO:4 (*ncm* reg2), SEQ ID NO:5 (*ncm* v1), SEQ ID NO:6 (*ncm* v2) and YFP (SEQ ID NO:8). El ARN bicatenario para el bioensayo de insectos se sintetizó y purificó mediante el uso de un AMBION® MEGASCRIP® RNAi Kit al seguir las instrucciones del fabricante (INVITROGEN) o HiScribe® T7 In Vitro Transcription Kit al seguir las instrucciones del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA). Las concentraciones de ARNs se midieron mediante el uso de un espectrofotómetro NANODROP™ 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE).

Construcción de vectores de transformación vegetal.

Los vectores de entrada que albergan un constructo de gen objetivo para la formación de horquilla que comprenden segmentos de *ncm* (SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:77) se ensamblan mediante el uso de una combinación de fragmentos químicamente sintetizados (DNA2.0, Menlo Park, CA) y métodos estándar de clonación molecular. La formación de horquilla intramolecular mediante transcritos primarios de ARN se facilita mediante la disposición (dentro de una sola unidad de transcripción) de dos copias de un segmento del gen objetivo en orientación opuesta entre sí, los dos segmentos están separados por una secuencia de enlace (*por ejemplo*, SEQ ID NO:19). Por lo tanto, el transcripto de ARNm primario contiene las dos secuencias de segmentos génicos *ncm* como grandes repeticiones invertidas entre sí, separadas por la secuencia de enlace. Una copia de un promotor (*por ejemplo* ubiquitina 1 de maíz, patente de Estados Unidos No. 5,510,474; 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV); promotor del virus baciliforme de la caña de azúcar (ScBV); promotores a partir de genes de la actina de arroz; promotores de ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 de maíz; promotor de ALS; promotor del gen de faseolina; *cab*; *rubisco*; *LAT52*; *Zm13*; *y/o appg*) se usa para impulsar la producción del transcripto de horquilla de ARNm primario, y un fragmento que comprende una región 3' no traducida, por

ejemplo, pero no se limita a, un gen de peroxidasa 5 de maíz (ZmPer5 3'UTR v2; patente de Estados Unidos No. 6,699,984), AtUbi10, AtEfl, o StPinII se usa para terminar la transcripción del gen que expresa el ARN de horquilla.

5 Los vectores de entrada pDAB126948 y pDAB126954 comprenden un constructo de v2-RNA *ncm* (SEQ ID NO:17) que comprende un segmento de *ncm* (SEQ ID NO:1).

10 Los vectores de entrada descritos anteriormente se usan en reacciones de recombinación GATEWAY® estándar con un vector de destino binario típico para producir vectores de transformación de la expresión de ARN en horquilla de *ncm* para transformaciones de embriones de maíz mediadas por *Agrobacterium*.

15 El vector de destino binario comprende un gen de tolerancia a herbicidas (ariloxialcanoato dioxigenasa; *AAD-1 v3*) (patente de Estados Unidos 7,838,733, y Wright y otros (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107:20240-5) bajo la regulación de un promotor operable en la planta (por ejemplo, promotor del virus baciliforme de la caña de azúcar (ScBV) (Schenk y otros (1999) Plant Mol. Biol. 39:1221-30) o ZmUbi1 (patente de Estados Unidos 5,510,474)). Un 5'UTR y un intrón se colocan entre el extremo 3' del segmento promotor y el codón de inicio de la región codificante *AAD-1*. Un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen de lipasa de maíz (ZmLip 3'UTR; patente de Estados Unidos 7,179,902) se usa para finalizar la transcripción del ARNm *AAD-1*.

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

Ejemplo 5: Detección de genes objetivo candidatos

30 El ARNd sintético diseñado para inhibir las secuencias de genes objetivo identificadas en el ejemplo 2 causó mortalidad e inhibición del crecimiento cuando se administró a WCR en ensayos basados en la dieta. Se observó que *Ncm reg1*, *ncm reg2*, *ncm v1* y *ncm v2* exhibían una eficacia mucho mayor en este ensayo sobre otros ARNdss tamizados.

35 Los bioensayos replicados demostraron que la ingestión de preparaciones de ARNdss derivadas de *ncm reg1*, *ncm reg2*, *ncm v1* y *ncm v2* resultó en la mortalidad y/o inhibición del crecimiento de las larvas del gusano de la raíz del maíz occidental. La tabla 2 y la tabla 3 muestran los resultados de los bioensayos de alimentación basados en la dieta de larvas del WCR después de 9 días de exposición a estos ARNdss, así como también los resultados obtenidos con una muestra de control negativo de ARNdss preparada a partir de una región codificante de la proteína fluorescente amarilla (YFP) (SEQ ID NO:8).

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

Nombre del Gen	Dosis (ng/cm ²)	N	Media (% de mortalidad) ± EEM*	Media (GI) ± EEM
<i>ncm reg1</i>	500	7	86,50 ± 4,35 (A)	0,77 ± 0,06 (A)
<i>ncm reg2</i>	500	8	76,14 ± 3,99 (A)	0,75 ± 0,06 (A)
<i>ncm v1</i>	500	8	85,20 ± 3,51 (A)	0,96 ± 0,01 (A)
<i>ncm v2</i>	500	4	87,10 ± 3,40 (A)	0,95 ± 0,03 (A)
TE**	0	10	19,29 ± 4,36 (B)	-0,01 ± 0,08 (B)
Agua	0	10	12,88 ± 3,20 (B)	0,05 ± 0,08 (B)
YFP***	500	11	18,29 ± 1,98 (B)	0,14 ± 0,08 (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).

60 **TE = tampón Tris HCl (1 mM) más EDTA (0,1 mM), pH 7,2.

***YFP = proteína fluorescente amarilla

Tabla 3. Resumen de la potencia oral de ARNdS de *ncm* en larvas del WCR (ng/cm²).

Nombre del Gen	LC ₅₀	Intervalo	GI ₅₀	Intervalo
<i>ncm reg1</i>	7,04	4,87 - 9,96	4,20	1,61 - 10,89
<i>ncm reg2</i>	17,32	11,46 - 25,99	8,20	2,21 - 30,41
<i>ncm v1</i>	2,39	2,05 - 2,73	17,00	7,60 - 38,00
<i>ncm v2</i>	2,52	2,21 - 2,85	18,19	12,82 - 25,82

Se ha sugerido previamente que ciertos genes de *Diabrotica* spp. pueden ser explotados para el control de insectos mediado por ARNi. Véase publicación de patente de Estados Unidos No. 2007/0124836, que describe 906 secuencias, y patente de Estados Unidos No. 7,612,194, que describe 9112 secuencias. Sin embargo, se determinó que muchos genes sugeridos para tener utilidad para el control de insectos mediado por ARNi no son eficaces para controlar *Diabrotica*. También se determinó que las secuencias *ncm reg1*, *ncm reg2*, *ncm v1* y *ncm v2* cada una proporciona un control superior sorprendente e inesperado de *Diabrotica*, en comparación con otros genes sugeridos para tener utilidad para el control de insectos mediado por ARNi.

Por ejemplo, *anexina*, *beta espectralina 2* y *mtRP-L4* cada uno fue sugerido en la patente de Estados Unidos No. 7,612,194 ser eficaz en el control de insectos mediado por ARNi. La SEQ ID NO:21 es la secuencia de ADN de *anexina* región 1 (Reg 1) y la SEQ ID NO:22 es la secuencia de ADN de *anexina* región 2 (Reg 2). La SEQ ID NO:23 es la secuencia de ADN de *beta espectralina 2* región 1 (Reg 1) y la SEQ ID NO:24 es la secuencia de ADN de *beta espectralina 2* región 2 (Reg2). La SEQ ID NO:25 es la secuencia de ADN de *mtRP-L4* región 1 (Reg 1) y la SEQ ID NO:26 es la secuencia de ADN de *mtRP-L4* región 2 (Reg 2). También se usó una secuencia YFP (SEQ ID NO:8) para producir ARNdS como un control negativo.

Cada una de las secuencias mencionadas anteriormente se usó para producir ARNdS por los métodos del ejemplo 3. La estrategia usada para proporcionar moldes específicos para la producción de ARNdS se muestra en la figura 2. Los ADNs moldes destinados para usar en la síntesis de ARNdS se prepararon por PCR mediante el uso de los pares de cebadores en la tabla 4 y (como molde de PCR) la primera cadena de ADNc se preparó a partir de ARN total aislado de larvas de primer estadio del WCR. (YFP se amplificó a partir de un clon de ADN). Para cada región del gen objetivo seleccionado, 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 sentido amplificadas. La segunda reacción incorporó la secuencia promotora de T7 en los extremos 5' de las cadenas antisentido. Los dos fragmentos amplificados por PCR para cada región de los genes objetivo se mezclaron en cantidades aproximadamente iguales, y la mezcla se usó como molde de transcripción para la producción de ARNdS. Véase figura 2. El ARN bicatenario se sintetizó y purificó mediante el uso de un AMBION® MEGASCRIP™ RNAi Kit al seguir las instrucciones del fabricante (INVITROGEN). Las concentraciones de ARNdS se midieron mediante el uso de un espectrofotómetro NANODROP™ 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE) y cada uno de los ARNdS se probó mediante los mismos métodos de bioensayo basados en la dieta descritos anteriormente. La Tabla 4 enumera las secuencias de los cebadores usados para producir las moléculas de ARNdS de *anexina* Reg1, *anexina* Reg2, *beta espectralina 2* Reg1, *beta espectralina 2* Reg2, *mtRP-L4* Reg1 y *mtRP-L4* Reg2. Las secuencias del cebador YFP para usar en el método representado en la figura 2 también se enumeran en la tabla 4. La Tabla 5 presenta los resultados de los bioensayos de alimentación basados en la dieta de larvas del WCR después de 9 días de exposición a estas moléculas de ARNdS. Los bioensayos replicados demostraron que la ingestión de estos ARNdS no produjo mortalidad ni inhibición del crecimiento de las larvas del gusano de la raíz del maíz occidental por encima de lo observado con las muestras de control de tampón TE, agua o proteína YFP.

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

	Gen (Región)	ID del cebador	Secuencia
Par 5	YFP	YFP-F_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACACCATG GGCTCCAGCGGCGCCC (SEQ ID NO:27)
	YFP	YFP-R	AGATCTTGAAGGCGCTCTTCAGG (SEQ ID NO:28)
Par 6	YFP	YFP-F	CACCATGGGCTCCAGCGGCGCCC (SEQ ID NO:29)
	YFP	YFP-R_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGATCTT GAAGGCGCTCTTCAGG (SEQ ID NO:30)

ES 2 811 279 T3

	Gen (Región)	ID del cebador	Secuencia
5	Par 7	<i>anexina</i> (Reg 1)	Ann-F1_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTCCAA CAGTGGTTCCTTATC (SEQ ID NO:31)
		<i>anexina</i> (Reg 1)	Ann-R1 CTAATAATTCTTTTTAATGTTCTGAGG (SEQ ID NO:32)
10	Par 8	<i>anexina</i> (Reg 1)	Ann-F1 GCTCCAACAGTGGTTCCTTATC (SEQ ID NO:33)
		<i>anexina</i> (Reg 1)	Ann-R1_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTAATAA TTCTTTTTTAATGTTCTGAGG (SEQ ID NO:34)
15	Par 9	<i>anexina</i> (Reg 2)	Ann-F2_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGATTGTTAC AAGCTGGAGAACTTCTC (SEQ ID NO:35)
		<i>anexina</i> (Reg 2)	Ann-R2 CTTAACCAACAACGGCTAATAAGG (SEQ ID NO:36)
20	Par 10	<i>anexina</i> (Reg 2)	Ann-F2 TTGTTACAAGCTGGAGAACTTCTC (SEQ ID NO:37)
		<i>anexina</i> (Reg 2)	Ann-R2T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTTAACC AACACGGCTAATAAGG (SEQ ID NO:38)
25	Par 11	<i>beta-spect2</i> (Reg 1)	Betasp2-F1_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGATGTT GGCTGCATCTAGAGAA (SEQ ID NO:39)
		<i>beta-spect2</i> (Reg 1)	Betasp2-R1 GTCCATTCGTCCACTGCA (SEQ ID NO:40)
30	Par 12	<i>beta-spect2</i> (Reg 1)	Betasp2-F1 AGATGTTGGCTGCATCTAGAGAA (SEQ ID NO:41)
		<i>beta-spect2</i> (Reg 1)	Betasp2-R1_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCCATT CGTCCATCCACTGCA (SEQ ID NO:42)
35	Par 13	<i>beta-spect2</i> (Reg 2)	Betasp2-F2_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAGATG AACACCAGCGAGAAA (SEQ ID NO:43)
		<i>beta-spect2</i> (Reg 2)	Betasp2-R2 CTGGGCAGCTTCTTGTTCCTC (SEQ ID NO:44)
40	Par 14	<i>beta-spect2</i> (Reg 2)	Betasp2-F2 GCAGATGAACACCAGCGAGAAA (SEQ ID NO:45)
		<i>beta-spect2</i> (Reg 2)	Betasp2-R2_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGGGCA GCTTCTTGTTCCTC (SEQ ID NO:46)
45	Par 15	<i>mtRP-L4</i> (Reg 1)	L4-F1_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTGAAA TGTTAGCAAATATAACATCC (SEQ ID NO:47)
		<i>mtRP-L4</i> (Reg 1)	L4-R1 ACCTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG (SEQ ID NO:48)
50	Par 16	<i>mtRP-L4</i> (Reg 1)	L4-F1 AGTGAAATGTTAGCAAATATAACATCC (SEQ ID NO:49)
		<i>mtRP-L4</i> (Reg 1)	L4-R1_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGAACCTCTC ACTTCAAATCTTGACTTTG (SEQ ID NO:50)
55	Par 17	<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-F2_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAGTC AAGATTTGAAGTGAGAGGT (SEQ ID NO:51)
		<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-R2 CTACAAATAAAACAAGAAGGACCCC (SEQ ID NO:52)
60	Par 18	<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-F2 CAAAGTCAAGATTTGAAGTGAGAGGT (SEQ ID NO:53)
		<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-R2_T7 TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTACAAA TAAAACAAGAAGGACCCC (SEQ ID NO:54)

65

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

Nombre del Gen	Dosis (ng/cm ²)	Peso larvario medio vivo (mg)	Media del % de mortalidad	Media de la inhibición del crecimiento
<i>anexina-Reg 1</i>	1000	0,545	0	-0,262
<i>anexina-Reg 2</i>	1000	0,565	0	-0,301
<i>beta spectrin2</i> Reg 1	1000	0,340	12	-0,014
<i>beta spectrin2</i> Reg 2	1000	0,465	18	-0,367
<i>mtRP-L4</i> Reg 1	1000	0,305	4	-0,168
<i>mtRP-L4</i> 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 = tampón Tris HCl (10 mM) más EDTA (1 mM), pH 8.
 **YFP = proteína fluorescente amarilla

Ejemplo 6: producción de tejidos de maíz transgénico que comprenden ARNdss insecticidas

Transformación mediada por *Agrobacterium*. Las células, tejidos y plantas de maíz transgénicos que producen una o más moléculas de ARNdss insecticidas (por ejemplo, al menos una molécula de ARNdss que incluye una molécula de ARNdss dirigida a un gen que comprende *ncm*; SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:77) a través de la expresión de un gen quimérico integrado de forma estable dentro del genoma de la planta se producen seguidos de la transformación mediada por *Agrobacterium*. Los métodos de transformación de maíz que emplean vectores de transformación binarios o superbinarios se conocen en la técnica, como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 8,304,604, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. Los tejidos transformados se seleccionan por su capacidad de crecer en medio que contiene Haloxifop y se tamizan para la producción de ARNdss, según corresponda. Las porciones de tales cultivos de tejidos transformados pueden presentarse a larvas recién nacidas del gusano de la raíz del maíz para bioensayo, esencialmente como se describe en el ejemplo 1.

Iniciación del cultivo de *Agrobacterium*. Las reservas de glicerol de células de la cepa DA113192 de *Agrobacterium* (WO 2012/016222A2) que albergan un vector de transformación binario como se describió anteriormente (ejemplo 4) se rayan en placas de medio mínimo AB (Watson y otros (1975) J. Bacteriol. 123: 255-64) que contienen antibióticos apropiados y se cultivan a 20 °C durante 3 días. Luego los cultivos se rayan en placas YEP (g/L: extracto de levadura, 10; peptona, 10; NaCl, 5) que contienen los mismos antibióticos y se incuban a 20 °C durante 1 día.

Cultivo de *Agrobacterium*. El día del experimento, se prepara una solución de reserva de medio de inoculación y acetosiringona en un volumen apropiado para el número de constructos en el experimento y se pipetea en un matraz estéril desechable de 250 mL. El medio de inoculación ((Frame y otros (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 de MS; Vitaminas de MS Modificadas por ISU 1X (Frame y otros, Ibid.) 68,4 g/L de sacarosa; 36 g/L de glucosa; 115 mg/L de L-prolina; y 100 mg/L de mioinositol; a pH 5,4). Se añade acetosiringona al matraz que contiene medio de inoculación a una concentración final de 200 µM a partir de una solución de reserva de 1 M en dimetilsulfóxido al 100 % y la solución se mezcla completamente.

Para cada constructo, 1 o 2 asas de inoculación llenas de *Agrobacterium* a partir de la placa YEP se suspenden en 15 mL de medio de inoculación/solución de reserva de acetosiringona en un tubo de centrifuga desechable estéril de 50 mL y la densidad óptica de la solución a 550 nm (DO₅₅₀) se mide en un espectrofotómetro. Luego la suspensión se diluye a DO₅₅₀ de 0,3 a 0,4 mediante el uso de una mezcla adicional de medio de inoculación/acetosiringona. Luego el tubo de la suspensión de *Agrobacterium* se coloca horizontalmente en un conjunto de agitador de plataforma establecido a alrededor de 75 rpm a temperatura ambiente y se agita durante 1 a 4 horas mientras se realiza la disección de embriones.

Esterilización de mazorca y aislamiento embrionario. Los embriones inmaduros de maíz se obtienen a partir de la línea endogámica B104 de plantas de *Zea mays* (Hallauer y otros (1997) Crop Science 37: 1405-1406) cultivadas en invernadero y auto-o sibpolinizadas para producir mazorcas. Las mazorcas se cosechan aproximadamente de 10 a 12

días después de la polinización. En el día experimental, las mazorcas descascaradas se esterilizan superficialmente por inmersión en una solución al 20 % de blanqueador comercial (Blanqueador Germicida ULTRA CLOROX®, hipoclorito sódico al 6,15 %; con dos gotas de TWEEN 20) y se agitan durante 20 a 30 minutos, seguido de tres enjuagues en agua desionizada estéril en una campana de flujo laminar. Los embriones cigóticos inmaduros (de 1,8 a 2,2 mm de largo) se diseccionan asépticamente a partir de cada mazorca y se distribuyen aleatoriamente en tubos de microcentrífuga que contienen 2,0 mL de una suspensión apropiada de células de *Agrobacterium* en medio de inoculación líquido con acetosiringona 200 µM, en la que se habían añadido 2 µL de surfactante BREAK-THRU® S233 al 10 % (EVONIK INDUSTRIES; Essen, Alemania). Para un conjunto dado de experimentos, se usan embriones a partir de mazorcas agrupadas para cada transformación.

Cocultivo de *Agrobacterium*. Después del aislamiento, los embriones se colocan en una plataforma basculante durante 5 minutos. El contenido del tubo se vierte sobre una placa de medio de cocultivo, que contiene 4,33 g/L de sales de MS; Vitaminas de MS Modificadas por ISU 1X; 30 g/L de sacarosa; 700 mg/L de L-prolina; 3,3 mg/L de dicamba en KOH (ácido 3,6-dicloro-*o*-anísico o ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico); 100 mg/L de mioinositol; 100 mg/L de hidrolizado enzimático de caseína; 15 mg/L de AgNO₃; acetosiringona 200 µM en DMSO; y 3 g/L de GELZAN™, a pH 5,8. El líquido de la suspensión de *Agrobacterium* se elimina con una pipeta de transferencia estéril y desechable. Luego los embriones se orientan con el escutelo hacia arriba mediante el uso de unas pinzas estériles con la ayuda de un microscopio. La placa se cierra, se sella con cinta médica 3M™ MICROPORE™ y se coloca en una incubadora a 25 °C con luz continua a aproximadamente 60 µmol m⁻²s⁻¹ de radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés).

Selección de callos y regeneración de eventos transgénicos. Después del período de cocultivo, los embriones se transfieren al Medio de Reposo, que está compuesto por 4,33 g/L de sales de MS; Vitaminas de MS Modificadas por ISU 1X; 30 g/L de sacarosa; 700 mg/L de L-prolina; 3,3 mg/L de dicamba en KOH; 100 mg/L de mioinositol; 100 mg/L de hidrolizado enzimático de caseína; 15 mg/L de AgNO₃; 0,5 g/L de MES (monohidrato de ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico; PHYTOTECNOLOGIES LABR.; Lenexa, KS); 250 mg/L de carbenicilina; y 2,3 g/L de GELZAN™; a pH 5,8. No se mueven más de 36 embriones a cada placa. Las placas se colocan en una caja de plástico transparente y se incuban a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50 µmol m⁻²s⁻¹ de PAR de 7 a 10 días. Luego los embriones callosos se transfieren (<18/placa) al Medio de Selección I, que está compuesto por Medio de Reposo (anteriormente) con ácido R-Haloxifop 100 nM (0,0362 mg/L; para la selección de callos que albergan el gen AAD-1). Las placas se devuelven a cajas transparentes y se incuban a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50 µmol m⁻²s⁻¹ de PAR por 7 días. Luego, los embriones callosos se transfieren (<12/placa) al Medio de Selección II, que está compuesto por Medio de reposo (anteriormente) con ácido R-Haloxifop 500 nM (0,181 mg/L). Las placas se devuelven a cajas transparentes y se incuban a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50 µmol m⁻²s⁻¹ de PAR por 14 días. Esta etapa de selección permite que el callo transgénico proliferare y se diferencie aún más.

Los callos embriogénicos proliferantes se transfieren (<9/placa) al medio de pre-regeneración. El Medio de Pre-regeneración contiene 4,33 g/L de sales de MS; Vitaminas de MS Modificadas por ISU 1X; 45 g/L de sacarosa; 350 mg/L de L-prolina; 100 mg/L de mioinositol; 50 mg/L de hidrolizado enzimático de caseína; 1,0 mg/L de AgNO₃; 0,25 g/L de MES; 0,5 mg/L de ácido naftaleneacético en NaOH; 2,5 mg/L de ácido abscísico en etanol; 1 mg/L de 6-bencilaminopurina; 250 mg/L de carbenicilina; 2,5 g/L de GELZAN™; y 0,181 mg/L de ácido Haloxifop; a pH 5,8. Las placas se almacenan en cajas transparentes y se incuban a 27 °C con luz continua a aproximadamente 50 µmol m⁻²s⁻¹ de PAR por 7 días. Los callos en regeneración se transfieren (<6/placa) al medio de regeneración en PHYTATRAYS™ (SIGMA-ALDRICH) y se incuban a 28 °C con 16 horas de luz/8 horas de oscuridad por día (a aproximadamente 160 µmol m⁻²s⁻¹ de PAR) durante 14 días o hasta que se desarrollen brotes y raíces. El medio de regeneración contiene 4,33 g/L de sales de MS; Vitaminas de MS Modificadas por ISU 1X; 60 g/L de sacarosa; 100 mg/L de mioinositol; 125 mg/L de carbenicilina; 3 g/L de goma GELLAN™; y 0,181 mg/L de ácido R-Haloxifop; a pH 5,8. Luego se aíslan pequeños brotes con raíces primarias y se transfieren al Medio de Elongación sin selección. El Medio de Elongación contiene 4,33 g/L de sales de MS; Vitaminas de MS Modificadas por ISU 1X; 30 g/L de sacarosa; y 3,5 g/L de GELRITE™: a pH 5,8.

Los brotes de plantas transformadas seleccionados por su capacidad de crecer en medio que contiene Haloxifop se trasplantan de PHYTATRAYS™ a macetas pequeñas rellenas con medio de crecimiento (PROMIX BX; PREMIER TECH HORTICULTURE), cubiertas con copas o HUMI-DOMES (ARCO PLASTICS), y luego se endurecen en una cámara de crecimiento CONVIRON (27 °C día/24 °C noche, fotoperíodo de 16 horas, 50-70 % de HR, 200 µmol m⁻²s⁻¹ de PAR). En algunos casos, las plántulas transgénicas putativas se analizan para el número relativo de copias del transgen mediante ensayos de PCR en tiempo real cuantitativos mediante el uso de cebadores diseñados para detectar el gen de tolerancia a herbicidas AAD1 integrado dentro del genoma del maíz. Además, los ensayos de ADN qPCR se usan para detectar la presencia de la secuencia de enlace y/o secuencia objetivo en transformantes putativos. Las plántulas transformadas seleccionadas se trasladan a un invernadero para un mayor crecimiento y pruebas.

Transferencia y establecimiento de plantas To en el invernadero para bioensayo y producción de semillas. Cuando las plantas alcanzan la etapa V3-V4, se trasplantan a la mezcla de suelo IE CUSTOM BLEND (PROFILE/METRO MIX 160) y crecen en el invernadero hasta el florecimiento (Tipo de exposición a la luz: foto o asimilación; Límite alto de luz: 1200 de PAR; 16 horas de duración del día; 27 °C día/24 °C noche).

Las plantas que se usarán para los bioensayos de insectos se trasplantan a partir de macetas pequeñas a TINUS™ 350-4 ROOTRAINERS® (SPENCER-LEMAIRE INDUSTRIES, Acheson, Alberta, Canadá;) (una planta por evento por

ROOTRAINER®). Aproximadamente cuatro días después del trasplante a ROOTRAINERS®, las plantas se infestan para el bioensayo.

5 Plantas de la generación T₁ se obtienen al polinizar las sedas de plantas transgénicas T₀ con polen recolectado a partir de plantas de la línea endogámica B104 no transgénica u otros donantes de polen apropiados, y plantar las semillas resultantes. Se realizan cruces recíprocos cuando es posible.

Ejemplo 7: Análisis moleculares de tejidos de maíz transgénico

10 Los análisis moleculares (por ejemplo, ARN qPCR) de los tejidos de maíz se realizan en muestras de hojas recolectadas de plantas cultivadas en invernadero el día anterior o el mismo día en que se evalúa el daño a la alimentación de la raíz.

15 Los resultados de los ensayos de ARN qPCR para el gen objetivo se usan para validar la expresión del transgen. Los resultados del ensayo de ARN qPCR para la secuencia intermedia entre las secuencias repetidas (que es integral a la formación de moléculas de horquilla de ARNs) en los ARNs expresados también se pueden usar para validar la presencia de transcritos en horquilla. Los niveles de expresión de ARN transgénico se miden con relación a los niveles de ARN de un gen de maíz endógeno.

20 Los análisis de ADN qPCR para detectar una porción de la región codificante AAD1 en el ADN genómico se usan para estimar el número de copias de inserción transgénica. Las muestras para estos análisis se recogen a partir de plantas cultivadas en cámaras ambientales. Los resultados se comparan con los resultados de los ensayos de ADN qPCR diseñados para detectar una porción de un gen nativo de una sola copia, y los eventos simples (que tienen una o dos copias de los transgenes) se avanzan para estudios adicionales en el invernadero. Los resultados se comparan con los resultados de los ensayos de ADN qPCR diseñados para detectar una porción de un gen nativo de una sola copia, y los eventos simples (una o dos copias de los transgenes) se avanzan para estudios adicionales.

Adicionalmente, los ensayos de qPCR diseñados para detectar una porción del gen de resistencia a espectinomicina (SpecR; albergado en los plásmidos del vector binario fuera del ADN-T) se usan para determinar si las plantas transgénicas contenían secuencias de cadena principal de plásmidos integrados extraños.

30 Nivel de expresión de transcripción de ARN: qPCR objetivo. Los eventos de células callosas o plantas transgénicas se analizan mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de la secuencia objetivo para determinar el nivel de expresión relativo del transgen, en comparación con el nivel de transcripto de un gen interno de maíz (SEQ ID NO:55; GENBANK No. de acceso BT069734), que codifica una proteína similar a TIP41 (es decir, un homólogo de maíz de No. de acceso de GENBANK AT4G34270; que tiene una puntuación de tBLASTX del 74 % de identidad). El ARN se aísla mediante el uso de Norgen BioTek Total RNA Isolation Kit (Norgen, Thorold, ON). El ARN total se somete a un tratamiento con DNase1 en columna de acuerdo con el protocolo sugerido por el estuche. Luego se cuantifica el ARN en un espectrofotómetro NANODROP 8000 (THERMO SCIENTIFIC) y la concentración se normaliza a 50 ng/μL. La primera cadena de ADNc se prepara mediante el uso de un estuche de síntesis de ADNc de alta capacidad (INVITROGEN) en un volumen de reacción de 10 μL con 5 μL de ARN desnaturalizado, sustancialmente de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. El protocolo se modifica ligeramente para incluir la adición de 10 μL de oligonucleótido T20VN (IDT) 100 μM (SEQ ID NO:56; TTTTTTTTTTTTTTTTTTNN, donde V es A, C o G, y N es A, C, G o T/U) dentro del tubo de 1 mL de mezcla de reserva del cebador aleatorio, para preparar una reserva de trabajo de cebadores aleatorios combinados y oligo dT.

45 Después de la síntesis de ADNc, las muestras se diluyen 1:3 con agua libre de nucleasas y se almacenan a -20 °C hasta su análisis.

50 Ensayos de PCR en tiempo real separados para el gen objetivo y el transcripto similar a TIP41 se realizan en un LIGHTCYCLER™ 480 (ROCHE DIAGNOSTICS, Indianapolis, IN) en volúmenes de reacción de 10 μL. Para el ensayo del gen objetivo, las reacciones se corren con cebadores HpNcm1v2 FWD Set 1 (SEQ ID NO:57) y HpNCM1v2 REV Set1 (SEQ ID NO:58), y una sonda IDT Custom Oligo HpNcm1v2 PRB Set1, marcada con FAM y doble enfriamiento con los extintores negros Zen y Iowa. Para el ensayo del gen de referencia similar a TIP41, se usan los cebadores TIPmxF (SEQ ID NO:59) y TIPmxR (SEQ ID NO:60), y la sonda HXTIP (SEQ ID NO:61) marcada con HEX (hexaclorofluoresceína).

55 Todos los ensayos incluyen controles negativos de no molde (solo mezcla). Para las curvas estándar, también se incluye un blanco (agua en el pozo fuente) en la placa fuente para verificar la contaminación cruzada de la muestra. Las secuencias de cebadores y sondas se establecen en la tabla 7. Las recetas de los componentes de reacción para la detección de los diversos transcritos se describen en la tabla 8, y las condiciones de las reacciones de PCR se resumen en la tabla 9. El resto fluorescente FAM (6-carboxi fluoresceína amidita) se excita a 465 nm y la fluorescencia se mide a 510 nm; los valores correspondientes para el resto fluorescente HEX (hexaclorofluoresceína) son 533 nm y 580 nm.

65

Tabla 7. Secuencias de oligonucleótidos para análisis moleculares de niveles de transcritos en maíz transgénico.

Objetivo	Oligonucleótido	Secuencia
Ncm	HpNcm1v2 FWD Set1	TGCTGCTTGTGCTTGTATTATTG (SEQ ID NO:57)
Ncm	HpNCM1v2 REV Set1	GGCATCATCGCCAGAGAATTA (SEQ ID NO:58)
Ncm	HpNcm1v2 PRB Set1 (Sonda FAM)	/56- FAM/ACTTGCACA/ZEN/GCAAACCTCTACCTCT/3 IABkFQ/
TIP41	TIPmxF	TGAGGGTAATGCCAACTGGTT (SEQ ID NO:59)
TIP41	TIPmxR	GCAATGTAACCGAGTGTCTCTCAA (SEQ ID NO:60)
TIP41	HXTIP (Sonda HEX)	TTTTTGGCTTAGAGTTGATGGTGTACTGATGA (SEQ ID NO:61)
*Proteína similar a TIP41.		

Tabla 8. Recetas de reacción de PCR para la detección de transcritos.

	<i>ncm</i>	Gen similar a TIP
Componente	Concentración Final	
Tampón Roche	1 X	1X
HpNcm1v2 FWD Set1	0,4 µM	0
HpNcm1v2 REV Set1	0,4 µM	0
HpNcm1v2 PRB Set1 (FAM)	0,2 µM	0
HEXtipZM F	0	0,4 µM
HEXtipZM R	0	0,4 µM
HEXtipZMP (HEX)	0	0,2 µM
ADNc (2,0 µL)	NA	NA
Agua	Hasta 10 µL	Hasta 10 µL

Tabla 9. Condiciones del termociclador para ARN qPCR.

Detección de gen objetivo y gen similar a TIP41			
Proceso	Temp.	Tiempo	No. ciclos
Activación objetivo	95 °C	10 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	10 seg	40
Extensión	60 °C	40 seg	
Adquirir FAM o HEX	72 °C	1 seg	
Frío	40 °C	10 seg	1

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

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

Todos los materiales y equipos se tratan con RNASFZAP™ (AMBION/INVITROGEN) antes de su uso. Las muestras de tejido (100 mg a 500 mg) se recogen en tubos SAFELOCK EPPENDORF de 2 mL, se rompen con un pulverizador de tejidos KLFCKO™ (GARCIA MANUFACTURING, Visalia, CA) con tres cuentas de tungsteno en 1 mL de TRIZOL (INVITROGEN) durante 5 minutos, luego se incuban a temperatura ambiente (TA) durante 10 minutos. Opcionalmente, las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 4 °C a 11 000 rpm y el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo SAFELOCK EPPENDORF de 2 mL. Después se añaden 200 µL de cloroformo al homogenado, el tubo se mezcla por inversión durante 2 a 5 minutos, se incuba a TA 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 añaden 600 µL de isopropanol al 100 %, seguido de incubación a TA durante 10 minutos a 2 horas, luego se centrifuga a 12 000 x g durante 10 minutos a 4 a 25 °C. El sobrenadante se desecha y el sedimento de ARN se lava dos veces con 1 mL de etanol al 70 %, con centrifugación a 7500 x g durante 10 minutos a 4 a 25 °C entre lavados. El etanol se desecha y el sedimento se seca brevemente al aire durante 3 a 5 minutos antes de resuspender en 50 µL de agua libre de nucleasas.

El ARN total se cuantifica mediante el uso del NANODROP 8000® (THERMO-FISHER) y las muestras se normalizan a 5 µg/10 µL. Luego se añaden 10 µL de glioxal (AMBION/INVITROGEN) a cada muestra. Se dispensan de 5 a 14 ng de la mezcla de marcadores estándar de ARN DIG (ROCHE APPLIED SCIENCE, Indianapolis, IN) y se añaden a un volumen igual de glioxal. Las muestras y los ARN marcadores se desnaturalizan a 50 °C durante 45 minutos y se almacenan en hielo hasta que se cargan en un gel de agarosa SEAKEM GOLD (LONZA, Allendale, NJ) al 1,25 % en tampón de corrida glioxal NORTHERNMAX 10 X (AMBION/INVITROGEN). Los ARNs se separan por electroforesis a 65 voltios/30 mA durante 2 horas y 15 minutos.

Después de la electroforesis, el gel se enjuaga en SSC 2X durante 5 minutos y se forma una imagen en una estación GEL DOC (BIORAD, Hercules, CA), luego el ARN se transfiere pasivamente a una membrana de nylon (MILLIPORE) durante la noche a TA, mediante el uso de SSC 10X como tampón de transferencia (SSC 20X consiste en cloruro de sodio 3 M y citrato trisódico 300 mM, pH 7,0). Después de la transferencia, la membrana se enjuaga en SSC 2X durante 5 minutos, el ARN se reticula con UV a 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 secuencia antisentido de la SEQ ID NO:17, según corresponda) marcada con digoxigenina por medio de un procedimiento ROCHE APPLIED SCIENCE DIG. La hibridación en el tampón recomendado es 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 película durante 1 a 30 minutos, luego se desarrolla la película, todo por métodos recomendados por el proveedor del estuche DIG.

Determinación del número de copias del transgen. Las piezas de hojas de maíz aproximadamente equivalentes a 2 perforaciones se recolectan en placas de recolección de 96 pocillos (QIAGEN™). La interrupción del tejido se realiza con un pulverizador de tejido KLECKO™ (GARCIA MANUFACTURING, Visalia, CA) en el tampón de lisis API BIOSPRINT96™ (suministrado con un BIOSPRINT96™ PLANT KIT; QIAGEN™) con una perla de acero inoxidable. Después de la maceración de tejidos, el ADN genómico (ADNg) se aísla en formato de alto rendimiento mediante el uso de un BIOSPRINT96™ PLANT KIT y un robot de extracción BIOSPRINT96™. El ADN genómico se diluye 1:3 ADN: agua antes de ajustar la reacción qPCR.

Análisis de qPCR. La detección de transgenes mediante un ensayo de sonda de hidrólisis se realiza por PCR en tiempo real mediante el uso de un sistema LIGHTCYCLER®480. Los oligonucleótidos a usar en los ensayos de sonda de hidrólisis para detectar el gen objetivo (*por ejemplo, ncm*), la secuencia de enlace (*por ejemplo, SEQ ID NO:19*), y/o para detectar una porción del gen SpecR (*es decir* el gen de resistencia a la espectinomycin portado en los plásmidos del vector binario; SEQ ID NO:73; los oligonucleótidos SPC1 en la tabla 10), están diseñados mediante el uso de LIGHTCYCLER® PROBE DESIGN SOFTWARE 2.0. Además, los oligonucleótidos a usar en los ensayos de sonda de hidrólisis para detectar un segmento del gen de tolerancia a herbicidas AAD-1 (SEQ ID NO:67; los oligonucleótidos GAAD1 en la Tabla 10) están diseñados mediante el uso del software PRIMER EXPRESS (BIOSYSTEMS APLICADO). La tabla 10 muestra las secuencias de los cebadores y las sondas. Los ensayos se multiplexan con reactivos para un gen cromosómico endógeno del maíz (Invertasa (SEQ ID NO:64; GENBANK No. de acceso: U16123; referido en la presente descripción como IVR1), que sirve como una secuencia de referencia interna para garantizar que el ADNg esté presente en cada ensayo. Para la amplificación, se preparó la mezcla mLIGHTCYCLER®480 PROBES MASTER (ROCHE APPLIED SCIENCE) a una concentración final 1X en un volumen de reacción multiplex de 10 µL que contiene 0,4 µM de cada cebador y 0,2 µM de cada sonda (tabla 11). Se realiza una reacción de amplificación de dos etapas como se describe en la tabla 12. La activación y emisión de fluoróforos para las sondas marcadas con FAM y HEX son como se describió anteriormente; los conjugados CY5 se excitan al máximo a 650 nm y fluorescen al máximo a 670 nm.

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

Tabla 10. Secuencias de cebadores y sondas (con conjugado fluorescente) para las determinaciones del número de copias de genes y la detección del esqueleto del plásmido del vector binario.

Nombre	Secuencia
GAAD1-F	TGTTTCGGTTCCTCTACCAA (SEQ ID NO:65)
GAAD1-R	CAACATCCATCACCTTGACTGA (SEQ ID NO:66)
GAAD1-P (FAM)	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA (SEQ ID NO:67)
IVR1-F	TGGCGGACGACGACTTGT (SEQ ID NO:68)
IVR1-R	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT (SEQ ID NO:69)
IVR1-P (HEX)	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC (SEQ ID NO:70)
SPC1A	CTTAGCTGGATAACGCCAC (SEQ ID NO:71)
SPC1S	GACCGTAAGGCTTGATGAA (SEQ ID NO:72)
TQSPEC (CY5*)	CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA (SEQ ID NO:73)
Lazo_F	GGAACGAGCTGCTTGCGTAT (SEQ ID NO:74)
Lazo_R	CACGGTGCAGCTGATTGATG (SEQ ID NO:75)
Lazo_FAM	TCCCTCCGTAGTCAGAG (SEQ ID NO:76)
CY5 = Cianina-5	

Tabla 11. Componentes de reacción para el análisis del número de copias de genes y detección de esqueleto de plásmidos.

Componente	Amt. (µL)	Reserva	Concentración Final
tampón 2x	5,0	2x	1x
Cebador directo apropiado	0,4	10 µM	0,4
Cebador inverso apropiado	0,4	10 µM	0,4
Sonda apropiada	0,4	5 µM	0,2
Cebador directo IVR1	0,4	10 µM	0,4
Cebador inverso IVR1	0,4	10 µM	0,4
Sonda IVR1	0,4	5 µM	0,2
H ₂ O	0,6	NA*	NA
ADNg	2,0	ND**	ND
Total	10,0		
*NA = no aplicable			
**ND = No determinado			

Tabla 12. Condiciones de termociclador para ADN qPCR.

Análisis de números de copias genómicas			
Proceso	Temp.	Tiempo	No. ciclos
Activación objetivo	95 °C	10 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	10 seg	40
Extender y adquirir FAM, HEX o CY5	60 °C	40 seg	
Frío	40 °C	10 seg	1

Ejemplo 8: Bioensayo de maíz transgénico

Bioensayos de insectos. La bioactividad del ARNs de la presente invención producida en células vegetales se demuestra mediante métodos de bioensayos. Véase, por ejemplo, Baum y otros (2007) Nat. Biotechnol. 25(11): 1322-1326. Se puede demostrar la eficacia, por ejemplo, mediante alimentación de diversos tejidos vegetales o piezas de tejidos derivados a partir de una planta que producen un ARNs insecticida para apuntar a los insectos en un entorno de alimentación controlado. Alternativamente, los extractos se preparan a partir de diversos tejidos vegetales derivados de una planta que produce el ARNs insecticida, y los ácidos nucleicos extraídos se dispensan en la parte superior de las dietas artificiales para bioensayos como se describió anteriormente en la presente descripción. Los resultados de tales ensayos de alimentación se comparan con bioensayos realizados de manera similar que emplean tejidos control apropiados a partir de plantas huésped que no producen un ARNs insecticida, o con otras muestras de control. El crecimiento y la supervivencia de los insectos objetivo en la dieta de prueba se reduce en comparación con la del grupo de control.

Bioensayos de insectos con eventos de maíz transgénico. Se seleccionan dos larvas del gusano de la raíz del maíz occidental (de 1 a 3 días de edad) eclosionadas a partir de huevos lavados y se colocan en cada pocillo de la bandeja de bioensayo. Luego los pozos 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 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 del número total de insectos en cada tratamiento. Se observa mortalidad significativa. Las muestras de insectos se congelan a -20 °C durante dos días, luego se agrupan y pesan las larvas de insectos de cada tratamiento. El por ciento de inhibición del crecimiento se calcula como el peso promedio de los tratamientos experimentales dividido por el promedio del peso promedio de los tratamientos de dos pocillos control. Los datos se expresan como por ciento de inhibición del crecimiento (de los controles negativos). Los pesos medios que exceden el peso medio control se normalizan a cero. Se observa una inhibición del crecimiento significativa.

Bioensayos de insectos en el invernadero. Los huevos del gusano de la raíz del maíz occidental (WCR, *Diabrotica virgifera* LeConte) se reciben en el suelo a partir de CROP CHARACTERISTICS (Farmington, MN). Los huevos del WCR se incuban a 28 °C durante 10 a 11 días. Los huevos se lavan del suelo, se colocan en una solución de agar al 0,15 %, y la concentración se ajusta a aproximadamente 75 a 100 huevos por alícuota de 0,25 mL. Se instala una placa de eclosión en una placa de Petri con una alícuota de suspensión de huevo para monitorear las tasas de eclosión.

El suelo alrededor de las plantas de maíz que crecen en ROOTRANERS® se infestan de 150 a 200 huevos del WCR. Se permite que los insectos se alimenten durante 2 semanas, después de lo cual se otorga una "Calificación de Raíz" a cada planta. Una escala de lesión de nodo se utiliza para calificar, esencialmente de acuerdo con Oleson y otros (2005) J. Econ. Entomol. 98:1-8. Las plantas que pasan este bioensayo, que muestran lesiones reducidas, se trasplantan a macetas de 5 galones para la producción de semillas. Los trasplantes se tratan con insecticida para evitar daños mayores de gusano de la raíz y la liberación de insectos en los invernaderos. Las plantas son polinizadas a mano para la producción de semillas. Las semillas producidas por estas plantas se guardan para su evaluación en las generaciones de plantas T₁ y subsecuentes.

Las plantas de control negativo transgénico se generan por transformación con vectores que albergan genes diseñados para producir una proteína fluorescente amarilla (YFP). Las plantas de control negativo no transformadas se cultivan a partir de semillas de variedades de maíz parental a partir de los cuales se producen las plantas transgénicas. Los bioensayos se realizan con controles negativos incluidos en cada conjunto de materiales vegetales.

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

10-20 plantas de *Zea mays* transgénico T₀ se generan como se describe en el ejemplo 6. Otras 10-20 líneas independientes *Zea mays* T₁ que expresan ARNs en horquilla para un constructo de ARNi se obtienen para el desafío del gusano de la raíz del maíz. Los ARNs en horquilla son como se establece en la SEQ ID NO:17, o de cualquier otra manera que comprende además la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:77. Los ARNdss en horquilla adicionales se derivan, por ejemplo, a partir de secuencias de plagas de coleópteros tales como, por ejemplo, Cafl-180 (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2012/0174258), VatpaseC (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2012/0174259), Rho1 (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2012/0174260), VatpaseH (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2012/0198586), PPI-87B (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2013/0091600), RPA70 (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2013/0091601), RPS6 (solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos No. 2013/0097730), ROP (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 14/577,811), RNAPII140 (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 14/577,854), Dre4 (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 14/705,807), COPI alfa (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/063,199), COPI beta (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/063,203), COPI gamma (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/063,192) o COPI Delta (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/063,216). Estos se confirman a través de RT-PCR u otros métodos de análisis molecular.

Las preparaciones de ARN totales seleccionadas independiente de las líneas T₁ se usan opcionalmente para RT-PCR con cebadores diseñados para unirse en el conector del casete de expresión en horquilla en cada uno de los constructos de ARNi. Además, los cebadores específicos para cada gen objetivo en un constructo de ARNi se usan opcionalmente

5 para amplificar y confirmar la producción del ARNm preprocesado requerido para la producción de siARN *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión del ARN en horquilla en cada planta de *Zea mays* transgénica. El procesamiento de la horquilla de ARNs de los genes objetivo en siARN opcionalmente se confirma subsecuentemente en líneas transgénicas independientes mediante el uso de hibridaciones de transferencia de ARN.

10 Además, las moléculas de ARNi que tienen secuencias de discordancia con más del 80 % de identidad de secuencia con los genes objetivo afectan a los gusanos de la raíz del maíz de una manera similar a la observada con las moléculas de ARNi que tienen una identidad de secuencia del 100 % con los genes objetivo. El emparejamiento de la secuencia de discordancia con las secuencias nativas para formar un ARNs en horquilla en el mismo constructo de ARNi suministra siARNs procesados por la planta capaces de afectar el crecimiento, desarrollo y viabilidad de alimentación de plagas de coleópteros.

15 *In planta* el suministro de ARNs, siARN o miARN correspondiente a genes objetivo y la subsecuente absorción por plagas de coleópteros a través de la alimentación resulta en una regulación negativa de los genes objetivo en la plaga de coleópteros a través del silenciamiento génico mediado por ARN. Cuando la función de un gen objetivo es importante en una o más etapas de desarrollo, se afecta el crecimiento y/o desarrollo de la plaga de coleópteros, y en el caso de al menos uno del WCR, NCR, SCR, MCR, *D. balteata* LeConte *D. u. tenella*, *D. speciosa* Germar *D. u. undecimpunctata* Mannerheim y *Meligethes aeneus* Fabricius, conduce a la falta de infestación, alimentación y/o desarrollo exitoso, o conduce a la muerte de la plaga de coleópteros. La elección de genes objetivo y la aplicación exitosa de ARNi se usan luego para controlar las plagas de coleópteros.

25 Comparación fenotípica de líneas de ARNi transgénicas y no transformadas de *Zea mays*. Los genes o secuencias de plagas de coleópteros objetivo seleccionados para crear ARNs en horquilla no tienen similitud con ninguna secuencia génica de plantas conocida. Por lo tanto, no se espera que la producción o la activación de ARNi (sistémica) mediante constructos dirigidas a estos genes o secuencias de plagas de coleópteros tengan algún efecto nocivo en las plantas transgénicas. Sin embargo, el desarrollo y las características morfológicas de las líneas transgénicas se comparan con las plantas no transformadas, así como también aquellas de las líneas transgénicas transformadas con un vector "vacío" que no tiene un gen que exprese la horquilla. Se comparan las características de la raíz de la planta, el brote, el follaje y la reproducción. Se registran las características del brote de la planta, tales como la altura, el número y el tamaño de las hojas, el tiempo de florecimiento, el tamaño floral y la apariencia. En general, no hay diferencias morfológicas observables entre líneas transgénicas y aquellas sin expresión de moléculas de iARN objetivos cuando se cultivan *in vitro* y en tierra en el invernadero.

35 Ejemplo 10: *Zea mays* transgénico que comprende una secuencia de plaga de coleópteros y constructos de ARNi adicionales

40 Una planta de *Zea mays* transgénico que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe en una molécula de iARN que se dirige a un organismo distinto de una plaga de coleópteros se transforma secundariamente a través de *Agrobacterium* o metodologías WHISKERS™ (véase Petolino y Arnold (2009) Methods Mol. Biol. 526:59-67) para producir una o más moléculas de ARNs insecticidas (por ejemplo, al menos una molécula de ARNs que incluye una molécula de ARNs dirigida a un gen que comprende SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:77). Los vectores plasmídicos de transformación vegetal preparados esencialmente como se describe en el ejemplo 4 se suministran a través de *Agrobacterium* o métodos de transformación mediados por WHISKERS™ en células de maíz en suspensión o embriones de maíz inmaduros obtenidos a partir de una planta de *Zea mays* transgénico Hi II o B104 que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe en una molécula de iARN que se dirige a un organismo distinto de una plaga de coleópteros.

50 Ejemplo 11: *Zea mays* transgénico que comprende un constructo de ARNi y secuencias control de plaga de coleópteros adicionales

55 Una planta de *Zea mays* transgénico que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe en una molécula de iARN que se dirige a un organismo de plaga de coleópteros (por ejemplo, al menos una molécula de ARNs que incluye una molécula de ARNs dirigida a un gen que comprende la SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 77) se transforma secundariamente a través de *Agrobacterium* o metodologías WHISKERS™ (véase Petolino y Arnold (2009) Methods Mol. Biol. 526:59-67) para producir una o más moléculas de proteínas insecticidas, por ejemplo, proteínas insecticidas Cry3, Cry34 y Cry35. Los vectores plasmídicos de transformación vegetal preparados esencialmente como se describe en el ejemplo 4 se entregan a través de *Agrobacterium* o métodos de transformación mediados por WHISKERS™ en células de maíz en suspensión o embriones de maíz inmaduros obtenidos a partir de una planta de *Zea mays* transgénico B104 que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que se transcribe en una molécula de iARN que se dirige a un organismo plaga de coleópteros. Se obtienen plantas doblemente transformadas que producen molécula de iARN y proteínas insecticidas para el control de plagas de coleópteros.

65 Ejemplo 12: Transcriptoma del escarabajo del polen

Insectos: Se recolectaron larvas y escarabajos del polen adultos de los campos con plantas de colza florecidas (Giessen, Alemania). Los escarabajos adultos jóvenes (cada uno por grupo de tratamiento: $n = 20$; 3 réplicas) fueron retados al inyectar una mezcla de dos bacterias diferentes (*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*), una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y LPS bacteriano. Los cultivos bacterianos se cultivaron a 37 °C con agitación, y la densidad óptica se controló a 600 nm (OD600). Las células fueron cosechadas a OD600 ~1 por centrifugación y resuspendidas en solución salina fosfato tamponada. La mezcla se introdujo ventrolateralmente al pinchar el abdomen de los escarabajos del polen imagoes mediante el uso de una aguja de disección sumergida en una solución acuosa de 10 mg/mL de LPS (endotoxina *E. coli* purificada; Sigma, Taufkirchen, Alemania) y los cultivos bacterianos y de levadura. Junto con los escarabajos inmunes retados, se recolectaron escarabajos y larvas vírgenes ($n = 20$ por y 3 repeticiones de cada uno) en el mismo punto de tiempo.

Aislamiento de ARN: El ARN total se extrajo 8 h después de la inmunización de escarabajos y larvas congelados mediante el uso de TriReagent (Centro de Investigación Molecular, Cincinnati, OH, EUA) y se purificó mediante el uso de RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) en cada caso se siguieron las guías de los fabricantes. La integridad del ARN se verificó mediante el uso de un bioanalizador Agilent 2100 y un estuche de ARN 6000 Nano (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). La cantidad de ARN se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. El ARN se extrajo de cada uno de los grupos de tratamiento inducidos por el sistema inmune de adultos, los grupos controles de adultos y los grupos de larvas de forma individual, y subsecuentemente se combinaron cantidades iguales de ARN total en un grupo por muestra (adultos inmunes retados, adultos control y larvas) para la secuenciación.

Información del transcriptoma: La generación de datos de RNA-Seq y ensamblaje RNA-Seq de 100 pb de lectura única se llevó a cabo por separado en 5 µg de ARN total aislado de escarabajos adultos inmuno retados, escarabajos adultos vírgenes (control) y larvas no tratadas. La secuenciación se llevó a cabo por Eurofins MWG Operon mediante el uso de la plataforma Illumina HiSeq-2000. Esto produjo 20,8 millones de lecturas para la muestra de escarabajo control adulto, 21,5 millones de lecturas para la muestra de escarabajo adulto retado con LPS y 25,1 millones de lecturas para la muestra de larvas. Las lecturas agrupadas (67,5 millones) se ensamblaron mediante el uso de software ensamblador *Velvet/Oases* (M.H. Schulz y otros (2012) *Bioinformatics*. 28:1086-92; Zerbino & E. Birney (2008) *Genome Research*. 18:821-9). El transcriptoma contenía 55 648 secuencias.

Identificación de *ncm* del escarabajo del polen: Se usó una búsqueda tblastn del transcriptoma para identificar cóntigos coincidentes. Se usó como consulta la secuencia peptídica de *ncm* de *Tribolium castaneum* (Genbank XM_001811253.1). Se usó GAP5 (Bonfield JK & Whitwham (2010). *Bioinformatics* 26: 1699-1703) para la verificación de secuencias.

Ejemplo 13: Mortalidad del escarabajo del polen (*Meligethes aeneus*)

después del tratamiento con ARNi *ncm*

Los cebadores específicos de genes que incluyen la secuencia promotora de la polimerasa T7 en el extremo 5' se usaron para crear productos de PCR de aproximadamente 500 pb por PCR (SEQ ID NOS: 91-92). Los fragmentos de PCR se clonaron en el vector fácil pGEM T de acuerdo con el protocolo del fabricante y se enviaron a una compañía de secuenciación para verificar la secuencia. El ARNds fue producido por la ARN polimerasa T7 (MEGAscript® RNAi Kit, Applied Biosystems) a partir de un constructo de PCR generado a partir del plásmido secuenciado de acuerdo con el protocolo del fabricante.

La inyección de ~100 nL de ARNds (1 µg/µL) se realizó en larvas y escarabajos adultos con un micromanipulador bajo un estereomicroscopio de disección ($n = 10$, 3 repeticiones biológicas). Los animales se anestesiaron en hielo antes de ser pegados con cinta adhesiva doble. Los controles recibieron el mismo volumen de agua. Un ARNds de control negativo de IMPI (gen inhibidor de metaloproteinasas de insectos del lepidóptero *Galleria mellonella*) se condujeron. No se pudieron probar todos los controles en todas las etapas debido a la falta de animales.

Los escarabajos del polen se mantuvieron en placas Petri con polen seco y un tejido húmedo. Las larvas se criaron en cajas de plástico en inflorescencia de canola en un medio de agar/agua.

Tabla 13. Resultados del bioensayo de inyección del escarabajo del polen adulto.

Tratamiento	% de supervivencia media ± DE*				
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
<i>ncm</i>	100 ± 0	83 ± 21	80 ± 17	67 ± 15	60 ± 17
agua	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16	
<i>ncm</i>	37 ± 15	33 ± 15	30 ± 17	13 ± 6	

Tratamiento	% de supervivencia media \pm DE*				
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
agua	93 \pm 12	90 \pm 10	87 \pm 12	80 \pm 10	
* Desviación estándar					

Tabla 14. Resultados del bioensayo de inyección de larvas del escarabajo del polen.

Tratamiento	% de supervivencia media \pm DE*			
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6
<i>ncm</i>	100 \pm 0	73 \pm 15	50 \pm 10	37 \pm 25
Control negativo	100 \pm 0	100 \pm 0	97 \pm 6	73 \pm 21
* Desviación estándar				

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

Bioensayo de alimentación: Los escarabajos se mantuvieron sin acceso al agua en tubos de halcón vacíos 24 h antes del tratamiento. Una gota de ARNDs (~5 μ L) se colocó en una pequeña placa Petri y se añadieron de 5 a 8 escarabajos a la placa Petri. Los animales se observaron bajo un estereomicroscopio y aquellos que ingirieron la solución de dieta que contiene ARNDs se seleccionaron para el bioensayo. Los escarabajos se transfirieron a placas Petri con polen seco y un tejido húmedo. Los controles recibieron el mismo volumen de agua. Un ARNDs de control negativo de IMPI (gen inhibidor de metaloproteinasas de insectos del lepidóptero *Galleria mellonella*) se condujo. No se pudieron probar todos los controles en todas las etapas debido a la falta de animales.

Tabla 15. Resultados del bioensayo de alimentación de adultos.

Tratamiento	% de supervivencia media \pm DE*				
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
<i>ncm</i>	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	93 \pm 6	93 \pm 6
Control negativo	100 \pm 0	93 \pm 5,8	90 \pm 10	87 \pm 5,8	83 \pm 5,8
agua	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	93 \pm 3,8	93 \pm 3,8
	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16	
<i>ncm</i>	93 \pm 6	83 \pm 12	83 \pm 12	83 \pm 12	
Control negativo	80 \pm 10	80 \pm 10	80 \pm 10	77 \pm 12	
agua	93 \pm 3,8	87 \pm 10	80 \pm 13	80 \pm 13	
* Desviación estándar					

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

Mientras la presente descripción puede ser susceptible a diversas modificaciones y formas alternativas, los aspectos específicos de la descripción se han descrito a manera de ejemplo en la presente descripción en detalle. Sin embargo, debe entenderse que la presente descripción no pretende limitarse a las formas particulares descritas. Más bien, la presente descripción es para cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que caen dentro del alcance de la presente descripción como se define en las siguientes reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes legales.

Ejemplo 14: Transformación de hipocotilos de Canola mediada por *Agrobacterium* (*Brassica nanus*)

Preparación de *Agrobacterium*

La cepa de *Agrobacterium* que contiene un plásmido binario se extiende en placas de medio YEP (Bacto Peptone™ 20,0 g/L y extracto de levadura 10,0 g/L) que contienen estreptomina (100 mg/mL) y espectinomicina (50 mg/mL) y se incuba durante 2 días a 28 °C. La cepa propagada de *Agrobacterium* que contiene el plásmido binario se raspa de la placa estriada de 2 días mediante el uso de un asa de inoculación estéril. La cepa raspada de *Agrobacterium* que contiene el plásmido binario se inocula luego en 150 mL de líquido YEP modificado con estreptomina (100 mg/mL) y espectinomicina (50 mg/mL) en matraz(es) deflector(es) estériles 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 μ M, 2,4-D 1 μ M, pH 5,8) y se diluyen a la densidad apropiada (50 unidades Klett como se midió mediante el uso de un espectrofotómetro) antes de la transformación de hipocotilos de canola.

5 Transformación de canola

10 *Germinación de la semilla:* Las semillas de canola (var. NEXERA 710™) se esterilizan en superficie en Clorox™ al 10 % durante 10 minutos y se enjuagan tres veces con agua destilada estéril (las semillas están contenidas en filtros de acero durante este proceso). Las semillas se plantan para germinar en medio de Canola ½ MS (1/2 MS, sacarosa al 2 %, agar al 0,8 %) contenido en Phytatrays™ (25 semillas por Phytatray™) y se colocan en una cámara de crecimiento Percival™ con un régimen de crecimiento establecido a 25 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 5 días de germinación.

15 *Pre-tratamiento:* En el día 5, se cortan asépticamente segmentos de hipocotilo de alrededor de 3 mm de longitud, se descartan las secciones restantes de raíz y brote (se evita el secado de los segmentos de hipocotilo al sumergir los segmentos de hipocotilo en 10 mL de agua estéril milliQ™ durante el proceso de escisión). Los segmentos de hipocotilo se colocan horizontalmente sobre papel de filtro estéril en medio de inducción de callos, MSK1D1 (MS, 1 mg/L de cinetina, 1 mg/L de 2,4-D, 3,0 % de sacarosa, fitagar al 0,7 %) durante 3 días de pretratamiento en una cámara de crecimiento Percival™ con un régimen de crecimiento de 22-23 °C y un fotoperíodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad.

20 *Cocultivo con Agrobacterium:* El día antes del co-cultivo de *Agrobacterium*, los matraces de medio YEP que contienen los antibióticos apropiados se inoculan con la cepa de *Agrobacterium* que contiene el plásmido binario. Los segmentos de hipocotilo se transfieren del medio de inducción de callos de papel de filtro, MSK1D1, a placas Petri™ vacías de 100 x 25 mm que contienen 10 mL de medio M líquido para evitar que los segmentos de hipocotilo se sequen. Se usa una espátula en esta etapa para recoger los segmentos y transferir los segmentos a un nuevo medio. El medio M líquido se elimina con una pipeta y 40 mL de suspensión de *Agrobacterium* se añaden a la placa Petri™ (500 segmentos con 40 mL de solución de *Agrobacterium*). Los segmentos de hipocotilo se tratan durante 30 minutos con agitación periódica de la placa Petri™ para que los segmentos de hipocotilo permanezcan sumergidos en la solución de *Agrobacterium*. Al final del período de tratamiento, la solución de *Agrobacterium* se pipetea en un vaso de precipitados de desecho; se autoclavea y se descarta (la solución de *Agrobacterium* se elimina por completo para evitar el crecimiento excesivo de *Agrobacterium*). Los hipocotilos tratados se transfieren con fórceps de nuevo a las placas originales que contienen medios MSK1D1 cubiertos con papel de filtro (se debe tener cuidado para garantizar que los segmentos no se sequen). Los segmentos de hipocotilo transformados y los segmentos de hipocotilo de control no transformados se devuelven a la cámara de crecimiento Percival™ con una intensidad de luz reducida (al cubrir las placas con hoja de aluminio), y los segmentos de hipocotilo tratados se cocultivan con *Agrobacterium* por 3 días.

35 *Inducción de callos en medio de selección:* Después de 3 días de cocultivo, los segmentos de hipocotilo se transfieren individualmente con fórceps al medio de inducción de callos, MSK1D1H1 (MS, 1 mg/L de cinetina, 1 mg/L de 2,4-D, 0,5 g/L de MES, 5 mg/L de AgNO₃, 300 mg/L de Timentin™, 200 mg/L de carbenicilina, 1 mg/L de Herbiace™, sacarosa al 3 %, fitagar al 0,7 %) con un régimen de crecimiento establecido a 22-26 °C. Los segmentos de hipocotilo están anclados en el medio, pero no están profundamente embebidos dentro del medio.

40 *Selección y regeneración de brotes:* Después de 7 días en medio de inducción de callos, los segmentos de hipocotilo 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 AgNO₃, 300 mg/L de Timentin™, 200 mg/L de carbenicilina, 1 mg/L de Herbiace™, sacarosa al 3 %, fitagar al 0,7 %). Después de 14 días, los segmentos de hipocotilo que desarrollan brotes se transfieren al medio de regeneración 2 con aumento de selección, MSB3Z1H3 (MS, 3 mg/L de BAP, 1 mg/L de zeatina, 0,5 g/L de MES, 5 mg/L de AgNO₃, 300 mg/L de Timentin™, 200 mg/L de carbenicilina, 3 mg/L de Herbiace™, sacarosa al 3 %, fitagar al 0,7 %) con un régimen de crecimiento establecido a 22-26 °C.

45 *Elongación del brote:* Después de 14 días, los segmentos de hipocotilo que desarrollan brotes se transfieren del medio de regeneración 2 al medio de elongación del brote, MSMESH5 (MS, 300 mg/L de Timentin™, 5 mg/L de Herbiace™, sacarosa al 2 %, agar TC al 0,7 %) con régimen de crecimiento establecido a 22-26 °C. Los brotes que ya están alargados se aislaron de los segmentos de hipocotilo y se transfirieron a MSMESH5. Después de 14 días, los brotes restantes que no se han alargado en la primera ronda de cultivo en medio de medio de elongación del brote se transfieren al medio de elongación del brote fresco, MSMESH5. En esta etapa, todos los segmentos de hipocotilo restantes que no producen brotes se descartan.

50 *Inducción de raíz:* Después de 14 días de cultivo en el medio de elongación del brote, los brotes aislados se transfieren al medio MSMEST (MS, 0,5 g/L de MES, 300 mg/L de Timentin™, sacarosa al 2 %, agar TC al 0,7 %) para la inducción de raíz a 22-26 °C. Aquellos brotes que no producen raíces después de la incubación en la primera transferencia al medio MSMEST se transfieren para una segunda o tercera ronda de incubación en el medio MSMEST hasta que los brotes desarrollen raíces.

55 *Análisis por PCR:* Los segmentos de hipocotilo de canola transformados que se regeneraron en brotes que comprenden raíces se analizan adicionalmente a través de un ensayo de confirmación molecular de PCR. El tejido de la hoja se obtiene

a partir de los brotes verdes y se prueba a través del PCR para detectar la presencia del gen marcador de selección. Los brotes cloróticos se descartan y no se someten a análisis por PCR. Las muestras que se identifican como positivas para la presencia del gen marcador de selección se mantienen y cultivan en medio MSMEST para continuar el desarrollo y la elongación de los brotes y las raíces. Las muestras que se identifican como que no contienen el gen marcador de selección negativo de acuerdo con el análisis por PCR se descartan.

Las plantas de canola transformadas que comprenden brotes y raíces que son positivas por PCR para la presencia del gen marcador de selección se trasplantan al suelo en un invernadero. Después del establecimiento de las plantas de canola dentro del suelo, las plantas de canola se analizan adicionalmente para cuantificar el número de copias del casete de expresión del gen marcador de selección a través de un ensayo de PCR cuantitativo Invader™ y un Southern blot. Las plantas transgénicas a canola que se confirman que contienen al menos una copia del casete de expresión del gen marcador de selección se avanzan para un análisis adicional de la semilla. Las semillas obtenidas de estas plantas de canola transgénicas T₀, es decir, semillas de canola T₁, se analizan para detectar la presencia del gen objetivo.

Listado de secuencias

<110> Dow AgroSciences LLC

<120> MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO DE NUCAMPHOLIN PARA CONTROLAR LAS PLAGAS DE INSECTOS COLEÓPTEROS
<130> 971-1

<160> 99

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1047

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 1

```

atgccagata ccaaggatgc caagataacc aaggatgcta atttgagttc tcctgaacgt      60
aaaagacgaa gaaagagtag atctaaatct ccagaacgaa aagagaaaa gtcttcctaaa      120
aagaaagccc acaatagtag agacagagat tcatcagagg aaggttacia ccctaaagat      180
tatcagagat actatgggga agatcgccca aacagtgaca aatattggaa taaatatcca      240
aggaaagata ctaccaaagt tggcctaaaga tactatgatg cggctcccga agaactctggc      300
aagaaggggc cagatagaaa ttcagaggag aaggagttac caaagccaat ggagtctggt      360
cctgataaat cagtcatcaa accaagagaa agaaaaactg tagatatggt aacatcgagg      420
actggtggtg cttatatctc ccagcctaag ctacgattgt tacaagccag tattacagac      480
aaaacatcag cagcctatca gcgtatagca tgggaagcct taaagaaatc cgttcatggt      540
tacattaata aaattaacac ctcgatattt ggcatcatcg ccagagaatt attgcatgaa      600
aatatagtaa gaggtagagg tttgctgtgc aagtcaataa tacaagcaca agcagcatct      660
cctactttta caaacgttta cgcagcctta gtagctgtta ttaattcgaa gtttccaagt      720
ataggagagc ttttattgaa gaggttggtt ttgcagttca aaagagggtt taaacaaaat      780
aataagtcta tttgcatatc ggctactact ttcgtagctc atttagtaaa tcagagagtg      840
gcacatgaaa ttttggtttt ggagatactt acattggttg tggagactcc tacagatgat      900
tctgtggagg tggccatttc atttttgaag gaatgtggac aaaaactgac agaagtttca      960
agtagaggta ttactgctat atttgagatg ttaagaaaca ttttacctga aggccagcta     1020
gaaaaaaga attcagtaca tgattga                                           1047

```

ES 2 811 279 T3

<210> 2
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> Diabrotica virgifera

5

<400> 2

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

Met Pro Asp Thr Lys Asp Ala Lys Asp Thr Lys Asp Ala Asn Leu Ser
 1          5          10          15

Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Arg Lys Ser Arg Ser Lys Ser Pro Glu
 20          25          30

Arg Lys Glu Lys Lys Ser Ser Lys Lys Lys Ala His Asn Ser Arg Asp
 35          40          45

Arg Asp Ser Ser Glu Glu Gly Tyr Asn Pro Lys Asp Tyr Gln Arg Tyr
 50          55          60

Tyr Gly Glu Asp Arg Pro Asn Ser Asp Lys Tyr Trp Asn Lys Tyr Pro
 65          70          75          80

Arg Lys Asp Thr Thr Lys Val Gly Gln Arg Tyr Tyr Asp Ala Ala Pro
 85          90          95

Glu Glu Ser Gly Lys Lys Gly Pro Asp Arg Asn Ser Glu Glu Lys Glu
100          105          110

Leu Pro Lys Pro Met Glu Ser Val Pro Asp Lys Ser Val Ile Lys Pro
115          120          125

Arg Glu Arg Lys Thr Val Asp Met Leu Thr Ser Arg Thr Gly Gly Ala
130          135          140

Tyr Ile Pro Pro Ala Lys Leu Arg Leu Leu Gln Ala Ser Ile Thr Asp
145          150          155          160

Lys Thr Ser Ala Ala Tyr Gln Arg Ile Ala Trp Glu Ala Leu Lys Lys
165          170          175

Ser Val His Gly Tyr Ile Asn Lys Ile Asn Thr Ser Asn Ile Gly Ile
180          185          190

Ile Ala Arg Glu Leu Leu His Glu Asn Ile Val Arg Gly Arg Gly Leu
195          200          205

Leu Cys Lys Ser Ile Ile Gln Ala Gln Ala Ala Ser Pro Thr Phe Thr
210          215          220

Asn Val Tyr Ala Ala Leu Val Ala Val Ile Asn Ser Lys Phe Pro Ser
225          230          235          240

Ile Gly Glu Leu Leu Leu Lys Arg Leu Val Leu Gln Phe Lys Arg Gly
245          250          255
  
```

ES 2 811 279 T3

Phe Lys Gln Asn Asn Lys Ser Ile Cys Ile Ser Ala Thr Thr Phe Val
 260 265 270
 5 Ala His Leu Val Asn Gln Arg Val Ala His Glu Ile Leu Ala Leu Glu
 275 280 285
 10 Ile Leu Thr Leu Leu Val Glu Thr Pro Thr Asp Asp Ser Val Glu Val
 290 295 300
 15 Ala Ile Ser Phe Leu Lys Glu Cys Gly Gln Lys Leu Thr Glu Val Ser
 305 310 315 320
 20 Ser Arg Gly Ile Thr Ala Ile Phe Glu Met Leu Arg Asn Ile Leu His
 325 330 335
 25 Glu Gly Gln Leu Glu Lys Lys Asn Ser Val His Asp
 340 345

<210> 3
 <211> 411
 <212> ADN
 <213> Diabrotica virgifera

<400> 3
 30 gatgCGGctc ccgaagaatc tggcaagaag gggccagata gaaattcaga ggagaaggag 60
 ttaccaaagc caatggagtc tgttcctgat aatcagtc tcaaaccaag agaagaaaa 120
 35 actgtagata tgттаacatc gaggactggt ggtgcttata ttccccagc taagctacga 180
 ttgttacaag ccagtattac agacaaaaca tcagcagcct atcagcgtat agcatgggaa 240
 gccttaaaga aatccgttca tggttacatt aataaaatta acacctcgaa tattggcatc 300
 40 atcgccagag aattattgca tgaaaatata gtaagaggta gaggtttgct gtgcaagtca 360
 ataatacaag cacaagcagc atctcctact tttacaaacg tttacgcagc c 411

<210> 4
 <211> 407
 <212> ADN
 <213> Diabrotica virgifera

<400> 4
 50 cccttagtaa agaaatctta ggcagtgatg gtgagtctga atcaggttcc gaaggttcag 60
 aagaggaatc tgataatgaa aatgaggacg aagtcaagga ccaggaaca attattgaca 120
 atactgaaac gaatttaatt tctcttagaa gaacatata tttgactatt cagtctagtt 180
 55 tagatthttga agaatgtgca cataagctac tgaagatgga gttgaaacct ggacaagaaa 240
 tagaattgtg tcacatgttt cttgactgct ggcgagaaca aagaacctac gaaaagtttt 300
 atggctctttt ggctcaaaga ttttgtcaaa tcaacaaagt gtatatcgag cctttccaac 360
 60 aaatthtttaa agatacctat tctaccactc acagactaga tgctaac 407

65

ES 2 811 279 T3

<210> 5
 <211> 178
 <212> ADN
 <213> Diabrotica virgifera
 5
 <400> 5
 cagtcatcaa accaagagaa agaaaaactg tagatatggt aacatcgagg actggtggtg 60
 10 cttatattcc cccagctaag ctacgattgt tacaagccag tattacagac aaaacatcag 120
 cagcctatca gcgtatagca tgggaagcct taaagaaatc cgttcatggt tacattaa 178
 15
 <210> 6
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Diabrotica virgifera
 20 <400> 6
 attggcatca tcgccagaga attattgcat gaaaatatag taagaggtag aggtttgctg 60
 tgcaagtcaa taatacaagc acaagcagca tctcctactt ttacaaacgt ttacgcagcc 120
 25
 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido promotor
 <400> 7
 ttaatacgac tcactatagg gaga 24
 35
 <210> 8
 <211> 503
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Región codificante parcial
 <400> 8
 45 caccatgggc tcacagcggcg ccctgctggt ccacggcaag atcccctacg tggaggagat 60
 ggagggcaat gtggatggcc acaccttcag catccgcggc aagggtacg gcgatgccag 120
 cgtgggcaag gtggatgccc agttcatctg caccaccggc gatgtgcccg tgccctggag 180
 50 caccctgggtg accaccctga cctacggcgc ccagtgcttc gccaagtacg gccccgagct 240
 gaaggatttc tacaagagct gcatgccga tggctacgtg caggagcgca ccatcacctt 300
 cgagggcgat ggcaatttca agaccgcgc cgaggtgacc ttcgagaatg gcagcgtgta 360
 55 caatcgcgtg aagctgaatg gccagggctt caagaaggat ggccacgtgc tgggcaagaa 420
 tctggagttc aatttcaccc cccactgcct gtacatctgg ggcgatcagg ccaatcacgg 480
 60 cctgaagagc gccttcaaga tct 503
 65
 <210> 9
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 9
 5 ttaatacgac tcactatagg gagaggctgc gtaaaccgtt gtaaaag 47

 <210> 10
 <211> 46
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 10
 15 ttaatacgac tcactatagg gagagatgcg gctcccgaag aatctg 46

 <210> 11
 <211> 47
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 11
 25 ttaatacgac tcactatagg gagagttagc atctagtctg tgagtgg 47

 <210> 12
 <211> 49
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 12
 35 ttaatacgac tcactatagg gagaccctta gtaaagaaat ctaggcag 49

 <210> 13
 <211> 48
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 13
 45 ttaatacgac tcactatagg gagattaatg taaccatgaa cggatttc 48

 <210> 14
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 14
 55 ttaatacgac tcactatagg gagacagtca tcaaaccaag agaaag 46

 <210> 15
 <211> 47
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 65

ES 2 811 279 T3

<220>
 <223> Oligonucleótido cebador

5 <400> 15
 ttaatacgac tcactatagg gagaggctgc gtaaacgttt gtaaaag 47

<210> 16
 <211> 51
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido cebador

15 <400> 16
 ttaatacgac tcactatagg gagaattggc atcatcgcca gagaattatt g 51

<210> 17
 <211> 505
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

25 <400> 17

ggctgcgtaa acgtttgtaa aagtaggaga tgctgcttgt gcttgtatta ttgacttgca 60

30 cagcaaacct ctacctctta ctatatatttc atgcaataat tctctggcga tgatgccaat 120

gaatccttgc gtcatttggg gactagtacc ggttgggaaa ggtatgtttc tgcttctacc 180

tttgatatat atataataat tatcactaat tagtagtaat atagtatttc aagtattttt 240

35 ttcaaaataa aagaatgtag tatatagcta ttgcttttct gtagtttata agtgtgtata 300

ttttaattta taacttttct aatatatgac caaaacatgg tgatgtgcag gttgatccgc 360

40 ggtaagttg tgcgtgagtc cattgattgg catcatcgcc agagaattat tgcataaaaa 420

tatagtaaga ggtagaggtt tgctgtgcaa gtcaataata caagcacaag cagcatctcc 480

tactttttaca aacgtttacg cagcc 505

45 <210> 18
 <211> 678
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia artificial
 <400> 18

55

60

65

ES 2 811 279 T3

atgtcatctg gagcacttct ctttcatggg aagattcctt acgttgtgga gatggaaggg 60
 aatgttgatg gccacacctt tagcatacgt gggaaaggct acggagatgc ctcaagtggga 120
 5 aaggttgatg cacagttcat ctgcacaact ggtgatgttc ctgtgccttg gagcacacag 180
 tgctttgcc aagtatgtcc agagttgaag gacttctaca agtcctgtat gccagatggc 240
 tatgtgcaag agcgcacaat cacctttgaa ggagatggca acttcaagac tagggctgaa 300
 10 gtcacctttg agaatgggtc tgtctacaat aggggtcaaac tcaatgggtca aggcttcaag 360
 aaagatggtc atgtgttggg aaagaacttg gagttcaact tcactcccca ctgcctctac 420
 atctgggggtg accaagccaa ccacgggtctc aagtcagcct tcaagatctg tcatgagatt 480
 15 actggcagca aaggcgactt catagtggct gaccacacc agatgaacac tcccattggt 540
 ggaggtccag ttcatgttcc agagtatcat cacatgtctt accatgtgaa actttccaaa 600
 20 gatgtgacag accacagaga caacatgtcc ttgaaagaaa ctgtcagagc tgttgactgt 660
 cgcaagacct acctttga 678

25 <210> 19
 <211> 153
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Lazo

<400> 19

35 agtcatcacg ctggagcgca catataggcc ctccatcaga aagtcattgt gtatatctct 60
 cataggaac gagctgcttg cgtatttccc ttccgtagtc agagtcatca atcagctgca 120
 ccgtgtcgta aagcgggacg ttcgcaagct cgt 153

40 <210> 20
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 20

50 atgtcatctg gagcacttct ctttcatggg aagattcctt acgttgtgga gatggaaggg 60

55

60

65

ES 2 811 279 T3

aatgttgatg gccacacctt tagcatacgt gggaaaggct acggagatgc ctcagtggga 120
 aaggttgatg cacagttcat ctgcacaact ggtgatgttc ctgtgccttg gagcacactt 180
 5 gtcaccactc tcacctatgg agcacagtgc tttgccaaagt atggtccaga gttgaaggac 240
 ttctacaagt cctgtatgcc agatggctat gtgcaagagc gcacaatcac ctttgaagga 300
 gatggcaact tcaagactag ggctgaagtc acctttgaga atgggtctgt ctacaatagg 360
 10 gtcaaactca atgggtcaagg cttcaagaaa gatggctatg tgttgggaaa gaacttggag 420
 ttcaacttca ctccccactg cctctacatc tgggggtgacc aagccaacca cggctcctcaag 480
 15 tcagccttca agatctgtca tgagattact ggcagcaaag gcgacttcat agtggctgac 540
 cacaccaga tgaacactcc cattggtgga ggtccagttc atgttccaga gtatcatcac 600
 atgtcttacc atgtgaaact ttccaaagat gtgacagacc acagagacaa catgtccttg 660
 20 aaagaaactg tcagagctgt tgactgtcgc aagacctacc tttga 705

<210> 21
 <211> 218
 <212> ADN
 <213> Diabrotica virgifera

<400> 21

tagctctgat gacagagccc atcgagtttc aagccaaaca gttgcataaa gctatcagcg 60
 gattgggaac tgatgaaagt acaatmgtmg aaattttaag tgtmcacaac aacgatgaga 120
 ttataagaat ttcccaggcc tatgaaggat tgtaccaacg mtcattggaa tctgatatca 180
 35 aaggagatac ctcaggaaca ttaaaaaaga attattag 218

<210> 22
 <211> 424
 <212> ADN
 <213> Diabrotica virgifera

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (393)..(393)
 <223> n es a, c, g, ó t

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (394)..(394)
 <223> n es a, c, g, ó t

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (395)..(395)
 <223> n es a, c, g, ó t

<400> 22

ttgttacaag ctggagaact tctctttgct ggaaccgaag agtcagtatt taatgctgta 60

65

ES 2 811 279 T3

	ttctgtcaaa gaaataaacc acaattgaat ttgatattcg acaaatatga agaaattggt	120
	gggcatccca ttgaaaaagc cattgaaaac gagttttcag gaaatgctaa acaagccatg	180
5	ttacacctta tccagagcgt aagagatcaa gttgcatatt tggtaccag gctgcatgat	240
	tcaatggcag gcgtcgttac tgacgataga actttaatca gaattgttgt ttcgagatct	300
	gaaatcgatc tagaggaat caaacaatgc tatgaagaaa tctacagtaa aaccttggct	360
10	gataggatag cggatgacac atctggcgac tannnaaaag ccttattagc cgttgttggt	420
	taag	424
15	<210> 23 <211> 397 <212> ADN <213> Diabrotica virgifera	
20	<400> 23	
	agatgttggc tgcactaga gaattacaca agttcttcca tgattgcaag gatgtactga	60
	gcagaatagt ggaaaaacag gtatccatgt ctgatgaatt ggggaaggac gcaggagctg	120
25	tcaatgccct tcaacgcaa caccagaact tcctccaaga cctacaaaca ctccaatcga	180
	acgtccaaca aatccaagaa gaatcagcta aacttcaagc tagctatgcc ggtgatagag	240
	ctaaagaaat caccaacagg gagcaggaag tggtagcagc ctgggcagcc ttgcagatcg	300
30	cttgcgatca gagacacgga aaattgagcg atactggtga tctattcaaa ttctttaact	360
	tggtacgaac gttgatgcag tggatggacg aatggac	397
35	<210> 24 <211> 490 <212> ADN <213> Diabrotica virgifera	
40	<400> 24	
	gcagatgaac accagcgaga aaccaagaga tgttagtgtt gttgaattgt tgatgaacaa	60
	ccatcagaca ctcaaggctg agatcgaagc cagagaagac aactttacgg cttgtatttc	120
45	tttaggaaag gaattgttga gccgtaatca ctatgctagt gctgatatta aggataaatt	180
	ggtcgcgttg acgaatcaaa ggaatgctgt actacagagc tgggaagaaa gatgggagaa	240
50	cttgcaactc atcctcgagg tataccaatt cgccagagat gcggccgctc ccgaagcatg	300
	gttgatcgca caagaacctt acttgatgag ccaagaacta ggacacacca ttgacgacgt	360
	tgaaaacttg ataaagaaac acgaagcgtt cgaaaaatcg gcagcggcgc aagaagagag	420
55	attcagtgct ttggagagac tgacgacgct cgaattgaga gaaataaaga ggaacaaga	480
	agctgcccag	490
60	<210> 25 <211> 330 <212> ADN <213> Diabrotica virgifera	
65	<400> 25	

ES 2 811 279 T3

5
10

agtgaaatgt tagcaaatat aacatccaag tttcgtaatt gtacttgctc agttagaaaa	60
tattctgtag ttctactatc ttcaaccgaa aatagaataa atgtagaacc tcgcgaactt	120
gcctttcctc caaaatatca agaacctcga caagtttggg tggagagttt agatacgata	180
gacgacaaaa aattgggtat tcttgagctg catcctgatg tttttgctac taatccaaga	240
atagatatta tacatcaaaa tgtagatgg caaagtttat atagatatgt aagctatgct	300
catacaaagt caagatttga agtgagaggt	330

15

<210> 26
<211> 320
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

20
25
30

<400> 26

caaagtcaag atttgaagtg agaggtggag gtcgaaaacc gtggccgcaa aagggattgg	60
gacgtgctcg acatggttca attagaagtc cactttggag aggtggagga gttgttcag	120
gaccaaaatc tccaaccctt catttttaca tgattccatt ctacaccogt ttgctggggt	180
tgactagcgc actttcagta aaatttgccc aagatgactt gcacgttggt gatagtctag	240
atctgccaac tgacgaacaa agttatatag aagagctggt caaaagccgc ttttgggggt	300
ccttcttgtt ttattttag	320

35

<210> 27
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Oligonucleótido cebador

<400> 27
ttaatcgac tcaactatag gagacacat gggctccagc ggcgccc 47

45

<210> 28
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Oligonucleótido cebador

<400> 28
agatctgaa ggcgctctc agg 23

55

<210> 29
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60

<220>
<223> Oligonucleótido cebador

<400> 29
cacatgggc tccagcggcg ccc 23

65

<210> 30
<211> 47

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 30
 ttaatacgac tcactatagg gagaagatct tgaaggcgct ctcagg 47

10 <210> 31
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 31
 ttaatacgac tcactatagg gagagctcca acagtggctc cttatc 46

20 <210> 32
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

30 <400> 32
 ctaataattc tttttaatg ttctgagg 29

<210> 33
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido cebador

40 <400> 33
 gctccaacag tggctccta tc 22

<210> 34
 <211> 53
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido cebador

50 <400> 34
 ttaatacgac tcactatagg gagactaata attctttttt aatgttcctg agg 53

<210> 35
 <211> 48
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido cebador

60 <400> 35
 ttaatacgac tcactatagg gagattgta caagctggag aactctc 48

65 <210> 36
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 36
 ctaaccaac aacggctaataagg 24

10 <210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 37
 ttgtacaag ctggagaact tctc 24

20 <210> 38
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 38
 30 ttaatacgac tcaactatagg gagacttaac caacaacggc taataagg 48

<210> 39
 <211> 47
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 39
 40 ttaatacgac tcaactatagg gagaagatgt tggctgcatc tagagaa 47

<210> 40
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 40
 50 gtccattcgt ccatccactg ca 22

<210> 41
 <211> 23
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 41
 60 agatgttggc tgcactctaga gaa 23

<210> 42
 <211> 46
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 42
 ttaatacgac tcactatagg gagagtccat tcgtccatcc actgca 46

 10 <210> 43
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 43
 20 ttaatacgac tcactatagg gagagcagat gaacaccagc gaaaa 46

 <210> 44
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 44
 30 ctgggcagct tctgtttcc tc 22

 <210> 45
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 45
 40 gcagatgaac accagcgaga aa 22

 <210> 46
 <211> 46
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador
 50
 <400> 46
 ttaatacgac tcactatagg gagactgggc agcttctgt ttctc 46

 <210> 47
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador
 60
 <400> 47
 ttaatacgac tcactatagg gagaagtgaa atgtagcaa atataacatc c 51

 65 <210> 48
 <211> 26

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 48
 acctctcact tcaaacttg actttg 26

 10 <210> 49
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 49
 20 agtgaatgt tagcaaatat aacatcc 27

 <210> 50
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 50
 30 ttaatacgac tcactatagg gagaacctct cactcaaat ctgactttg 50

 <210> 51
 <211> 50
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 51
 40 ttaatacgac tcactatagg gagacaaagt caagattga agtgagaggt 50

 <210> 52
 <211> 25
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador
 50
 <400> 52
 ctacaataa aacaagaagg acccc 25

 <210> 53
 55 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 53
 caaagtcaag atttgaagt agaggt 26

 65 <210> 54
 <211> 49

ES 2 811 279 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido cebador

5 <400> 54
 ttaatacgac tcactatagg gagactacaa ataaaacaag aaggacccc 49

10 <210> 55
 <211> 1150
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 <400> 55

15 caacggggca gcactgcact gcactgcaac tgcgaatttc cgtcagcttg gagcgggtcca 60
 agcgcacctgc gaagcaaact acgccgatgg ctccggcggc ggcgtgggag ggtccgacgg 120
 20 ccgcgagact gaagacagcg gggcgggagg tgattcccgg cggcgtgcga gtgaaggggt 180
 gggatcatcca gtcccacaaa ggcctatcc tcaacgccgc ctctctgcaa cgctttgaag 240
 atgaacttca aacaacacat ttacctgaga tggtttttgg agagagtttc ttgtcacttc 300
 25 aacatacaca aactggcatc aaatttcatt ttaatgcgct tgatgcactc aaggcatgga 360
 agaaagaggc actgccacct gttgaggttc ctgctgcagc aaaatggaag ttcagaagta 420
 agccttctga ccaggttata cttgactacg actatacatt tacgacacca tattgtggga 480
 30 gtgatgctgt ggttgtgaac tctggcactc cacaacaag tttagatgga tgcggcactt 540
 tgtgttggga ggatactaat gatcggattg acattgttgc cctttcagca aaagaaccba 600
 ttcttttcta cgacgaggtt atcttgtatg aagatgagtt agctgacaat ggtatctcat 660
 35 ttcttactgt gcgagtgagg gtaatgcaa ctggttggtt tctgcttttg cgtttttggc 720
 tttagagtga tgggtgtactg atgaggttga gagacactcg gttacattgc ctgtttggaa 780
 40 acggcgacgg agccaagcca gtggtacttc gtgagtgtg ctggagggaa gcaacatttg 840
 ctactttgtc tgcgaaagga tacccttcgg actctgcagc gtacgcggac ccgaacctta 900
 ttgcccataa gcttcctatt gtgacgcaga agacccaaaa gctgaaaaat cctacctgac 960
 45 tgacacaaag gcgccctacc gcgtgtacat catgactgtc ctgtcctatc gttgcctttt 1020
 gtgtttgcca catgttgggg atgtacgttt ctatgacgaa acaccatagt ccatttcgcc 1080
 50 tggggcgaac agagatagct gattgtcatg tcacgtttga attagacat tccttagccc 1140
 tttttccccc 1150

<210> 56
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido cebador

60 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (22)..(22)
 <223> n es a, c, g, ó t

65 <400> 56

tttttttt vn 22
 <210> 57
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador
 10
 <400> 57
 ttgtgatgtt ggtggcgtat 20
 <210> 58
 15 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido cebador
 <400> 58
 tgttaaataa aaccccaaag atcg 24
 25 <210> 59
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador
 <400> 59
 35 tgagggtaat gccaaactgt t 21
 <210> 60
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador
 <400> 60
 45 gcaatgtaac cgagtgctc tcaa 24
 <210> 61
 <211> 32
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sonda
 55 <400> 61
 tttttggctt agagttgatg gtgtactgat ga 32
 <210> 62
 <211> 151
 60 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <400> 62
 65 gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcgggc agctttgatc aacgaccttt tggaaacttc 60

ES 2 811 279 T3

	ggcttcccct ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga	120
	cgacatcatt ccgtggcggtt atccagctaa g	151
5	<210> 63 <211> 69 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Región codificante parcial	
	<400> 63	
15	tgttcgggtc cctctaccaa gcacagaacc gtcgcttcag caacacctca gtcaagggtga	60
	tggtatggtg	69
20	<210> 64 <211> 4233 <212> ADN <213> Zea mays	
	<400> 64	
25	agcctgggtg ttccggagga gacagacatg atccctgccg ttgctgatcc gacgacgctg	60
	gacggcgggg gcgcgcgcag gccgttgctc ccggagacgg accctcgggg gcgtgctgcc	120
30	gccggcgcgg agcagaagcg gccgccggct acgccgaccg ttctcaccgc cgtcgtctcc	180
	gccgtgctcc tgctcgtcct cgtggcggtc acagtcctcg cgtcgcagca cgtcgcaggg	240
	caggctgggg gcgttcccgc gggcgaagat gccgtcgtcg tcgaggtggc cgcctcccgt	300
35	ggcgtggctg agggcgtgtc ggagaagtcc acggccccgc tcctcggctc cggcgcgctc	360
	caggacttct cctggaccaa cgcgatgctg gcgtggcagc gcacggcggt ccacttccag	420
	cccccaaga actggatgaa cggtagttg gaccctcgc catcggtgac gacgcgcgga	480
40	tcgtttttt ctttttctc ctcttctgg ctctaactg gttccgcgtt tctgtcacgg	540
	acgcctcgtg cacatggcga taccgatcc gcggccgcg tatactatc tacctcgacc	600
45	ggcttctcca gatccgaacg gtaagttggt ggctccgata cgatcgatca catgtgagct	660
	cggcatgctg cttttctcgc cgtgcctgct gctcctagca ttccacgtcc acgggtcgtg	720
	acatcaatgc acgatataat cgtatcggta cagagatatt gtccatcag ctgctagctt	780
50	tcgcgtattg atgtcgtgac attttgcacg caggctccgct gtatcacaag ggctgggtacc	840
	acctcttcta ccagtggaac ccggactccg cggatgagg caacatcacc tggggccacg	900
	ccgtctcgcg cgacctctc cactggctgc acctaccgct ggccatggtg cccgatcacc	960
55	cgtaagacgc caacggcgtc tggctccgggt cggcgacgcg cctgcccgcg ggccggatcg	1020
	tcatgctcta cacgggctcc acggcggagt cgtcggcgca ggtgcagaac ctccgggagc	1080
60	cggccgacgc gtccgacctg ctgctcgggg agtgggtcaa gtcggacgcc aaccgggtgc	1140
65		

ES 2 811 279 T3

	tggtgccgcc gccgggcatc gggccgacgg acttcccgga cccgacgacg gcgtgtcgga	1200
	cgccggccgg caacgacacg gcgtggcggg tcgccatcgg gtccaaggac cgggaccacg	1260
5	cggggctggc gctggtgtac cggacggagg acttctgtcg gtacgacccg gcgccggcgc	1320
	tgatgcacgc cgtgccgggc accggcatgt gggagtgcgt ggacttctac ccggtggccg	1380
	cgggatcagg cgccgcggcg ggcagcgggg acgggctgga gacgtccgcg gcgccgggac	1440
10	ccggggtgaa gcacgtgtc aaggctagcc tcgacgacga caagcacgac tactacgca	1500
	tcggcaccta cgaccggcg acggacacct ggacccccga cagcgggag gacgacgtcg	1560
	ggatcgccct ccggtacgac tatggcaagt actacgcgtc gaagacctc tacgaccccg	1620
15	tccttcgccg gcgggtgctc tgggggtggg tcggcgagac cgacagcgag cgcgcggaca	1680
	tcctcaaggg ctgggcatcc gtgcaggtag gtctcagggt ttgaggctag catggcttca	1740
	atcttgctgg catcgaatca ttaatgggca gatattataa cttgataatc tgggttggtt	1800
20	gtgtgtggtg gggatggtga cacacgcgcg gtaataatgt agctaagctg gttaaggatg	1860
	agtaatgggg ttgctgataa acgacagctc tgctaccatt acttctgaca cccgattgaa	1920
	ggagacaaca gtagggtag ccggtagggt tcgtcgactt gccttttctt ttttcctttg	1980
25	ttttgttgtg gatcgtccaa cacaaggaaa ataggatcat ccaacaaaca tggaagtaat	2040
	cccgtaaaac atttctcaag gaaccatcta gctagacgag cgtggcatga tccatgcatg	2100
30	cacaaacact agataggtct ctgcagctgt gatgttcctt tacatatacc accgtccaaa	2160
	ctgaatccgg tctgaaaatt gttcaagcag agaggccccg atcctcacac ctgtacacgt	2220
	ccctgtacgc gccgtcgtgg tctcccgta tcctgccccg tcccctccac gcggccacgc	2280
35	ctgctgcagc gctctgtaca agcgtgcacc acgtgagaat ttccgtctac tcgagcctag	2340
	tagttagacg ggaaaacgag aggaagcgca cggccaagc acaaacactt gcgcgggccc	2400
	gtgacttgtc tccggttggc tgagggcgcg cgacagagat gtatggcgcc gcgcgctgtc	2460
40	ttgtgtcttg tcttgctat acaccgtagt cagagactgt gtcaaagccg tccaacgaca	2520
	atgagctagg aaacgggtg gagagctggg ttcttgctt gcctcctgtg atgtctttgc	2580
	cttgcatagg gggcgagta ttagctttg cgttttactt cacgccaaag gatactgctg	2640
45	atcgtgaatt attattatta tatatatatc gaatatcgat ttcgtcgctc tcgtggggtt	2700
	ttattttcca gactcaaact tttcaaaagg cctgtgtttt agttctttt tccaattga	2760
50	gtaggcaagg cgtgtgagtg tgaccaacgc atgcatggat atcgtggtag actggtagag	2820
	ctgtcgttac cagcgcgatg cttgtatatg tttgcagtat tttcaaatga atgtctcagc	2880
	tagcgtacag ttgaccaagt cgacgtggag ggcgcacaac agacctctga cattattcac	2940
55	tttttttta ccatgccgtg cacgtgcagt caatcccag gacggtcctc ctggacacga	3000

60

65

ES 2 811 279 T3

agacgggagcag caacctgctc cagtggccgg tggaggaggt ggagaacctc cggatgagcg 3060
 gcaagagctt cgacggcgctc gcgctggacc gcggatccgt cgtgcccctc gacgtcggca 3120
 5 aggcgacgca ggtgacgccc caccgagcct gctgcagcga acgaactcgc gcgttgccgg 3180
 cccgcccga gctgacttag tttctctggc tgatcgaccg tgtgcctcgc tgcgtgcagt 3240
 tggacatcga ggctgtgttc gaggtggacg cgtcggacgc ggcgggctgc acggaggccg 3300
 10 acgtgacggt caactgcagc accagcgcag gcgcccggg cggggcctg ctccggcccgt 3360
 tcggccttct cgtgctggcg gacgacgact tgtccgagca gaccgccgtg tacttctacc 3420
 tgcctcaaggg cacggacggc agcctccaaa ctttctcttg ccaagacgag ctccaggatg 3480
 15 tatgttatga cttatgacca tgatgcatg cgcatttctt agctaggctg tgaagcttct 3540
 tgttgagttg tttcacagat gcttaccgtc tgctttgttt cgtatttcga ctaggcatcc 3600
 20 aaggcgaacg atctggttaa gagagtatac gggagcttgg tccctgtgct agatggggag 3660
 aatctctcgg tcagaatact ggtaagtttt tacagcgcca gccatgcatg tgttgccag 3720
 ccagctgctg gtactttgga cactcgttct tctcgcactg ctattattg cttctgatct 3780
 25 ggatgcacta caaattgaag gttgaccact ccatcgtgga gagctttgct caaggcggga 3840
 ggacgtgcat cacgtcgcga gtgtaccca cacgagccat ctacgactcc gcccgctct 3900
 tcctcttcaa caacgccaca catgctcag tcaaagcaaa atccgtcaag atctggcagc 3960
 30 tcaactccgc ctacatccgg ccatatccgg caacgacgac ttctctatga ctaaattaag 4020
 tgacggacag ataggcgata ttgcatactt gcatcatgaa ctatttgta caacagtgat 4080
 tgtttaattt atttgctgcc ttccttatcc ttcttgtaa actatatggt acacacatgt 4140
 35 atcattaggt ctagtgtgt tggtgcaaag aacttagac accagaggtt ccaggagtat 4200
 cagagataag gtataagagg gagcagggag cag 4233

40 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 65
 50 tggtcggtc cctctaccaa 20

<210> 66
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 66
 60 caacatccat caccttgact ga 22

<210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sonda

 5 <400> 67
 cacagaaccg tcgcttcagc aaca 24

 <210> 68
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 15 <400> 68
 tggcggacga cgacttgt 18

 <210> 69
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 25 <400> 69
 aaagtttga ggctgccgt 19

 <210> 70
 <211> 26
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sonda

 35 <400> 70
 cgagcagacc gccgtgtact tctacc 26

 40 <210> 71
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 71
 50 cttagctgga taacgccac 19

 <210> 72
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 72
 60 gaccgtaagg cttgatgaa 19

 <210> 73
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sonda

 <400> 73
 5 cgagattctc cgcgctgtag a 21

 <210> 74
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 74
 15 gtatgtttct gcttctacct ttgat 25

 <210> 75
 <211> 29
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

 <400> 75
 25 ccatgttttg gtcatatatt agaaaagtt 29

 <210> 76
 <211> 34
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sonda

 <400> 76
 35 agtaatatag tatttcaagt attttttca aaat 34

 <210> 77
 <211> 2681
 <212> ADN
 <213> Diabrotica virgifera

 <400> 77

 50

 55

 60

 65

ES 2 811 279 T3

	attaccaa	gtcaatgtca	ctcattactc	attaccaa	gtcaatgtca	ctgtcaggta	60
	acgtgcaatg	caaattgtca	atgtcaaact	taaaaatatt	ttcctgcaac	tgcatcaa	120
5	tgtaaatttt	atTTTTTTta	aatatgccag	ataccaagga	tgccaaggat	accaaggatg	180
	ctaatttgag	ttctcctgaa	cgtaaaagac	gaagaaagag	tagatctaaa	tctccagaac	240
	gaaaagagaa	aaagtcttcc	aaaaagaaag	cccacaatag	tagagacaga	gattcatcag	300
10	aggaagggtta	caaccctaaa	gattatcaga	gatactatgg	ggaagatcgc	ccaacacgtg	360
	acaaatattg	gaataaatat	ccaaggaaag	atactaccaa	agttggccaa	agatactatg	420
	atgctggctcc	cgaagaatct	ggcaagaagg	ggccagatag	aaattcagag	gagaaggagt	480
15	taccaaagcc	aatggagtct	gttcttgata	aatcagtc	caaaccaaga	gaaagaaaa	540
	ctgtagatat	gttaacatcg	aggactggtg	gtgcttatat	tccccagct	aagctacgat	600
	tgttacaagc	cagtattaca	gacaaaacat	cagcagccta	tcagcgtata	gcatgggaag	660
20	ccttaaagaa	atccgttcat	ggttacatta	ataaaattaa	cacctcgaat	attggcatca	720
	tcgccagaga	attattgcat	gaaaatatag	taagaggtag	aggtttgctg	tgcaagtcaa	780
25	taatacaagc	acaagcagca	tctcctactt	ttacaaacgt	ttacgcagcc	ttagtagctg	840
	ttattaattc	gaagtttcca	agtataggag	agcttttatt	gaagaggttg	gttttgagct	900
	tcaaagaggg	gtttaaacia	aataataagt	ctatttgcat	atcggctact	actttcgtag	960
30	ctcatttagt	aaatcagaga	gtggcacatg	aaattttggc	tttgagata	cttacattgt	1020
	tggtggagac	tctacagat	gattctgtgg	aggtggccat	ttcatttttg	aaggaatgtg	1080
	gacaaaaact	gacagaagtt	tcaagtagag	gtattactgc	tatatttgag	atgttaagaa	1140
35	acattttaca	tgaaggccag	ctagaaaaaa	agaattcagt	acatgattga	agttatgttt	1200
	caaataagga	aagacggatt	taaggatcat	gctgctgtcg	tagaagaatt	agatttagta	1260
40	gaagaggaag	atcaattcac	tcatcttatt	atgtagatg	atgttaaaga	ggctgatgca	1320
	gaggatatat	tgaatgtggt	caaatttgat	gagagttatg	aagaaatga	agataaatac	1380
	aaaaccctta	gtaaagaaat	cttaggcagt	gatggtgagt	ctgaatcagg	ttccgaaggt	1440
45	tcagaagagg	aatctgataa	tgaaaatgag	gacgaagtca	aggaccaggg	aacaattatt	1500
	gacaactactg	aaacgaattt	aatttctctt	agaagaacca	tatatttgac	tattcagtct	1560
	agtttagatt	ttgaagaatg	tgacacataag	ctactgaaga	tggagttgaa	acctggacaa	1620
50	gaaatagaat	tgtgtcacat	gtttcttgac	tgctgctgag	aacaaagaac	ctacgaaaag	1680
	ttttatggctc	ttttggctca	aagattttgt	caaatcaaca	aagtgtatat	cgagcctttc	1740
55	caacaaattt	ttaaagatac	ctattctacc	actcacagac	tagatgctaa	caggttaaga	1800
60							
65							

ES 2 811 279 T3

5
10
15
20
25

aacgtcagca	aatTTTTTgc	gcatttactt	tttacggatg	ccattggatg	ggaagtcctt	1860
gacatcatga	aattgaatga	agaggatacc	aatagttcta	gtaggatttt	cataaaaatc	1920
ttgtttcaag	aattggctga	atatatggga	ctaggaaaat	taaacgcaag	gctaaaggat	1980
gagaccctgc	aggcttattt	ttcaggactg	tttcttagag	ataaccctaa	gaataccaga	2040
ttttctatta	atTTTTTTac	ctctatcggg	ttgggaggat	taactgatga	actcagagaa	2100
catttaaaaa	atattccaaa	aatgatggaa	atgaagttag	ccactaaaga	aaaggaaagc	2160
agtggtagta	gtagttcaga	aagtagttct	gaggaagata	gtagtgacga	cagctctgaa	2220
gattcatcaa	gttctgaaga	cgatagaggc	aaaaagaaga	aaaaaaccaa	aaagctagaa	2280
gaaaaaatt	cgaaagtaaa	ttctaagtct	agacctagat	caaaagagaa	agaacacgca	2340
gacaaaccta	gagacaaaaca	tagaaaggaa	gatagacata	aatctgacaa	aatcccgat	2400
agatcctcgt	ccaaaaaata	ttctaaagaa	gataacaaga	ggaagaaaga	ctacgaatgg	2460
atgaagagca	gatatgaaga	tgatattaag	caattaaana	acgataaaag	ggtatttgaa	2520
aagtcttcca	aacgacgatc	aagatctaga	gacagggtaa	aagtcaagga	agagcgtaga	2580
cgtagaagca	gagaaagaag	aaggagctaa	gataatTTTT	taataaggat	ctatgtatat	2640
ttatgtaaac	atTTatttaa	tacatgTTTT	ttaaaaaaa	a		2681

30
<210> 78
<211> 1047
<212> ARN
<213> Diabrotica virgifera

35
40
45
50
55
60
65

augccagaua	ccaaggauGC	caaggauacc	aaggauGCUA	auuugaguuc	uccugaacgu	60
aaaagacgaa	gaaagaguag	aucuaaaucu	ccagaacgaa	aagagaaaaa	gucuuccaaa	120
aagaaagccc	acaauaguag	agacagagau	ucaucagagg	aagguuacaa	cccuaaagau	180
uaucagagau	acuaugggga	agaucgcca	aacagugaca	aaauuuggaa	uaaaauucca	240
aggaaagaua	cuaccaaagu	uggccaaaga	uacuaugaug	cggcucccga	agaaucuggc	300
aagaaggggc	cagauagaaa	uucagaggag	aaggaguuaC	caaagccaau	ggagucuguu	360
ccugauaaa	cagucauca	accaagagaa	agaaaaacug	uagauauguu	aacaucgagg	420
acugguggug	cuuauauucc	cccagcuaag	cuacgauugu	uacaagccag	uauuacagac	480
aaaacaucag	cagccuauca	gCGuauagca	ugggaagccu	uaaagaauc	cguucauggu	540
uacauuaaua	aaauuaacac	cucgaaauuu	ggcaucaucg	ccagagaaau	auugcaugaa	600
aaauauagua	gagguagagg	uuugcugugc	aagucaauaa	uacaagcaca	agcagcaucu	660
ccuacuuuuu	caaacguuuu	cgagccuuu	guagcuguuu	uuuuuucgaa	guuuccaagu	720
auaggagagc	uuuuauugaa	gagguugguu	uugcaguuca	aaagaggguu	uaaacaaaau	780

ES 2 811 279 T3

	aauaagucua uuugcauauc ggcuacuacu uucguagcuc auuuaguaaa ucagagagug	840
	gcacaugaaa uuuuggcuuu ggagauacuu acauuguugg uggagacucc uacagaugau	900
5	ucuguggagg uggccauuuc auuuuugaag gaauguggac aaaaacugac agaaguuuca	960
	aguagaggua uuacugcuau auuugagaug uuaagaaaca uuuuacauga aggccagcua	1020
	gaaaaaaga auucaguaca ugauuga	1047
10	<210> 79 <211> 411 <212> ARN <213> Diabrotica virgifera	
15	<400> 79	
	gaugcggcuc ccgaagaauc uggcaagaag gggccagaua gaaauucaga ggagaaggag	60
20	uuaccaaagc caauggaguc uguuccugau aaucaguca ucaaaccaag agaaagaaaa	120
	acuguagaua uguuaacauc gaggacuggu ggugcuuaua uccccccagc uaagcuacga	180
	uuguuacaag ccaguauuac agacaaaaca ucagcagccu aucagcguau agcaugggaa	240
25	gccuuuaaga aaucCGuucA ugguuacauu aauaaaaua acaccucgaa uauuggcauc	300
	aucgccagag aaauauugca ugaaaauaua guaagaggua gagguuugcu gugcaaguca	360
	auaaauacaag cacaagcagc aucuccuacu uuuacaaacg uuuacgcagc c	411
30	<210> 80 <211> 407 <212> ARN <213> Diabrotica virgifera	
35	<400> 80	
	cccuuaguua agaaaucuuu ggcagugaug gugagucuga aucagguucc gaagguucag	60
40	aagaggaauc ugauaaugaa aaugaggacg aagucaagga ccaggaaca auuauugaca	120
	auacugaaac gaauuuuuu ucucuuaaga gaaccuaua uuugacuauu cagucuaguu	180
	uagauuuuga agaauugca cauaagcuac ugaagaugga guugaaaccu ggacaagaaa	240
45	uagaaugug ucacauguuu cuugacugcu gcgcagaaca aagaaccuac gaaaaguuuu	300
	auggucuuuu ggcucaaaaga uuuugucaaa ucaacaaagu guauaucgag ccuuuccaac	360
	aaauuuuuua agauaccuau ucuaccacuc acagacuaga ugcuaac	407
50	<210> 81 <211> 178 <212> ARN <213> Diabrotica virgifera	
55	<400> 81	
	cagucaucaa accaagagaa agaaaaacug uagauauguu acaucgagg acugguggug	60
60	cuuauauucc cccagcuuag cuacgauugu uacaagccag uauuacagac aaaacaucag	120
	cagccuauca gcguauagca ugggaagccu uaaagaauc cguucauggu uacauuaa	178
65	<210> 82 <211> 120	

ES 2 811 279 T3

<212> ARN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 82

5
 auuggcauca ucgccagaga auuauugcau gaaaauauag uaagagguag agguuugcug 60
 ugcaagucaa uaauacaagc acaagcagca ucuccuacuu uuacaaacgu uuacgcagcc 120

<210> 83
<211> 2681
<212> ARN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 83

15
 auuaccaaau gucaauguca cucauuacuc auuaccaaau gucaauguca cugucaggua 60
 acgugcaaug caaaauuguca augucaaacu uaaaaauuu uuccugcaac ugcaucaaau 120
 20
 uguaaauiuu auuuuuuuua aaauugccag auaccaagga ugccaaggau accaaggau 180
 cuaauuugag uucuccugaa cguaaaagac gaagaaagag uagaucuaaa ucuccagaac 240
 25
 gaaaagagaa aaagucuucc aaaaagaaag cccacaauag uagagacaga gauucaucag 300
 aggaagguaa caaccuaaa gauuucagaga gauacuauug ggaagaucgc ccaacagug 360
 acaaauauug gaauaaauau ccaaggaaag auacuaccaa aguuggcaa agauacuauug 420
 30
 augcggcucc cgaagaauuc ggcaagaagg ggccagauag aaauucagag gagaaggagu 480
 uaccaaagcc aauggagucu guuccuguaa aaucagucan caaccaaga gaaagaaaa 540
 cuguagauau guuaacaucg aggacuggug gugcuuauau uccccagcu aagcuacgau 600
 35
 uguuacaagc caguauuaca gacaaaacau cagcagccua ucagcguaua gcaugggaag 660
 ccuuaaagaa auccguucau gguuacauua auaaaauua caccucgaau auuggcauca 720
 ucgccagaga auuauugcau gaaaauauag uaagagguag agguuugcug ugcaagucaa 780
 40
 uaauacaagc acaagcagca ucuccuacuu uuacaaacgu uuacgcagcc uuaguagcug 840
 uuauuuuuuc gaaguuuca aguauaggag agcuuuuuuu gaagagguug guuuugcagu 900
 45
 ucaaagagag guuuaaacaa aaauuaagu cuauuugcau aucggcuacu acuuucguag 960
 cucuuuuagu aaucagaga guggcacaug aaauuuugc uuuggagaua cuuacauugu 1020
 ugguggagac uccuacagau gauucugugg agguggccau uucauuuuug aaggaaugug 1080
 50
 gacaaaaacu gacagaaguu ucaaguagag guuuuacugc uauuuuugag auguuagaa 1140
 acauuuuaca ugaaggccag cuagaaaaaa agaauucagu acaugauuga aguuuuguu 1200
 caauuaagga aagacggauu uaaggaucau gcugcugucg uagaagaauu agauuuagua 1260

55

60

65

ES 2 811 279 T3

5 gaagaggaag aucaauucac ucaucuuuuu auguuagaug auguuuaaga ggcugaugca 1320
 gaggauuuu ugaauuguuu caaaauugau gagaguuaug aagaaauga agauaaauac 1380
 10 aaaacccuua guaaagaaau cuuaggcagu gauggugagu cugaaucagg uuccgaaggu 1440
 ucagaagagg aaucugauaa ugaaaaugag gacgaaguca aggaccaggg aacaauuuuu 1500
 gacaauacug aaacgaaauu aaauucucuu agaagaacca uauuuuugac uauucagucu 1560
 15 aguuuagauu uugaagaauug ugcacauaag cuacugaaga uggaguugaa accuggacaa 1620
 gaaauagaau ugugucacau guuucuugac ugcugcgag aacaaagaac cuacgaaaag 1680
 uuuuauuguc uuuuugcuca aagauuuugu caaaucaaca aaguguauuu cgagccuuuc 1740
 caacaaauuu uuaaagauac cuauucucc acucacagac uagaugcuaa cagguuaaga 1800
 aacgucagca aaauuuuugc gcauuuacuu uuucggagc ccauuggaug ggaaguccuu 1860
 20 gacaucauga aaauugaaga agaggauacc aauguucua guaggauuuu cauaaaaauc 1920
 uuguuucaag aaauggcuga auauauggga cuaggaaaau uaaacgcaag gcuaaaggau 1980
 gagaccucg aggcuuuuuu uucaggacug uuuccuagag auaacccaa gaaucacaga 2040
 25 uuuucuauua auuuuuuuac cucuaucggu uugggaggau uaacugauga acucagagaa 2100
 cauuuaaaaa auauucaaa aaugauggaa augaaguuaag ccacuaaaga aaaggaaagc 2160
 agugguagua guaguucaga aaguaguucu gaggaagaa guagugacga cagcucugaa 2220
 30 gauucaucaa guucugaaga cgauagaggc aaaaagaaga aaaaaacca aaagcuagaa 2280
 gaaaaaaau cgaaagaaa uucuaagucu agaccuagau caaaagagaa agaacacgca 2340
 gacaaaccua gagacaaaaca uagaaaggaa gauagacua aaucugacaa aaaucccgau 2400
 35 agauccucg ccaaaaaaua uucuaaagaa gaaacaaga ggaagaaaga cuacgaaugg 2460
 augaagagca gauaugaaga ugauuuuag cauuuuuuu acgauaaaag gguuuuuuua 2520
 40 aagucuucca aacgacgac aagaucuaga gacagguua aagucaagga agagcguaga 2580
 cguagaagca gagaaagaag aaggagcuaa gaaauuuuu uauuaaggau cuauguauuu 2640
 uuauguaaac auuuuuuuu uacauguuuu uaaaaaaaaa a 2681

45 <210> 84
 <211> 1658
 <212> ADN
 <213> Meligethes aeneus

50 <400> 84
 gcaatttcgt ttttgaagga aagtggtaa aaactcactg aggtgtcgag taaaggtatc 60
 55 aatgccatat ttgagatgtt gaggaatatt ctgcatgaag gacagttgga gaagagaata 120
 cagtacatga ttgaagtcac gttccaagtt cggaaagatg gtttcaagga tcatgctgct 180
 60 gttactgaag aactagatat tgttgaagag gaagatcagt ttactcacct aatcacattg 240

65

ES 2 811 279 T3

gatgatgtta aacaagctaa ctacagaggat atattgaatg tgtttaaatt tgatgataaa 300
 tatgaggaaa atgagggtaa atacaaaact ttaagtaagg aaattctcca gtcagacagt 360
 5 gaatcaggcg aatctggttc agaggggtct gaagaagact cggaagatga agaaggtgaa 420
 gaagatgaaa ccaaaaatca aaccattatt gataacacag aactaattt aatcacctta 480
 aggagaacca tctatctcac aatacaatcc agtttggatt ttgaggaatg tgcccataaa 540
 10 ttgatgaaaa tggagatcaa acctggacaa gagattgaat tgtgtcacat gttccttgat 600
 tgttgcgctg aacagcgta ctaacgaaaa ttcttcggcc tcctctcgca gcgcttctgc 660
 caaataaaca agactttcat cgaaccgttc caacaaattt tcaaagatac ctattccaca 720
 15 actcacagac ttgacgcaa tcgattgaga aacgtagca aattcttcgc gcatatttg 780
 ttcaccgacg ccatcggctg ggaagtgtc gatatcatga aattaaacga ggaagacacc 840
 20 aacagttcca gcaggatatt catcaagatt ttgttccagg agttgtccga atatatggga 900
 ttagcgaagt tgaataaaag gctaaaggat gaaactttac aggaatattt cgcggggcta 960
 tttccgaggg ataaccgaa gaacacgctt tcgcatca attttttcac gtcgatcggg 1020
 25 ttaggaggtc taacggacga gttgagggag cacttgaaaa acgtgcaaaa acatctggaa 1080
 gtgatggctt tgaaagcaga ttcgagcagc tctagcagca gtagcagcag ttccagtaac 1140
 gattccagca gcagttcaga ttctccgat gacgagggtt ccaggaagaa gaaaacaaaa 1200
 30 aaattgaaaa ccccggacaa aaagaagaaa cagaaagaag atgaaaaacc caaaaagaaa 1260
 agcgaggata aaccgaggaa caaacagac tatagagata gaagaaacga cgacagggaa 1320
 aagtttaaaa aatacagaaa caacgacgaa gaaagccaca gaagaagcag agaagatgca 1380
 35 agagaaaaat acagaggtca cgaggaaaga agaagcgacc acagagaaga ataccggccg 1440
 agagaacata gaggtagaga tagacgtag ttgtataata atgtatattt ttcgtagttt 1500
 40 aataaaataa attatacatt ttatagtgtt tcggagcatt caccaagcaa gggttttact 1560
 ttcggatagc aatggtgtag tacgtttttg aaggtgtcca cacacaccaa gccggtttta 1620
 tctaaatcta gagctatctt ccaaaagtct tcaaagga 1658

45 <210> 85
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> Meligethes aeneus
 50 <400> 85

Ala Ile Ser Phe Leu Lys Glu Ser Gly Gln Lys Leu Thr Glu Val Ser
 1 5 10 15
 55 Ser Lys Gly Ile Asn Ala Ile Phe Glu Met Leu Arg Asn Ile Leu His
 20 25 30

60

65

ES 2 811 279 T3

Glu Gly Gln Leu Glu Lys Arg Ile Gln Tyr Met Ile Glu Val Met Phe
 35 40 45
 5 Gln Val Arg Lys Asp Gly Phe Lys Asp His Ala Ala Val Thr Glu Glu
 50 55 60
 10 Leu Asp Ile Val Glu Glu Glu Asp Gln Phe Thr His Leu Ile Thr Leu
 65 70 75 80
 15 Asp Asp Val Lys Gln Ala Asn Ser Glu Asp Ile Leu Asn Val Phe Lys
 85 90 95
 20 Phe Asp Asp Lys Tyr Glu Glu Asn Glu Gly Lys Tyr Lys Thr Leu Ser
 100 105 110
 25 Lys Glu Ile Leu Gln Ser Asp Ser Glu Ser Gly Glu Ser Gly Ser Glu
 115 120 125
 30 Gly Ser Glu Glu Asp Ser Glu Asp Glu Glu Gly Glu Glu Asp Glu Thr
 130 135 140
 35 Lys Asn Gln Thr Ile Ile Asp Asn Thr Glu Thr Asn Leu Ile Thr Leu
 145 150 155 160
 40 Arg Arg Thr Ile Tyr Leu Thr Ile Gln Ser Ser Leu Asp Phe Glu Glu
 165 170 175
 45 Cys Ala His Lys Leu Met Lys Met Glu Ile Lys Pro Gly Gln Glu Ile
 180 185 190
 50 Glu Leu Cys His Met Phe Leu Asp Cys Cys Ala Glu Gln Arg Thr Tyr
 195 200 205
 55 Glu Lys Phe Phe Gly Leu Leu Ser Gln Arg Phe Cys Gln Ile Asn Lys
 210 215 220
 60 Thr Phe Ile Glu Pro Phe Gln Gln Ile Phe Lys Asp Thr Tyr Ser Thr
 225 230 235 240
 65 Thr His Arg Leu Asp Ala Asn Arg Leu Arg Asn Val Ser Lys Phe Phe
 245 250 255
 Ala His Leu Leu Phe Thr Asp Ala Ile Gly Trp Glu Val Leu Asp Ile
 260 265 270
 Met Lys Leu Asn Glu Glu Asp Thr Asn Ser Ser Ser Arg Ile Phe Ile
 275 280 285

ES 2 811 279 T3

Lys Ile Leu Phe Gln Glu Leu Ser Glu Tyr Met Gly Leu Ala Lys Leu
 290 295 300
 5 Asn Lys Arg Leu Lys Asp Glu Thr Leu Gln Glu Tyr Phe Ala Gly Leu
 305 310 315 320
 10 Phe Pro Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Arg Phe Ala Ile Asn Phe Phe
 325 330 335
 15 Thr Ser Ile Gly Leu Gly Gly Leu Thr Asp Glu Leu Arg Glu His Leu
 340 345 350
 20 Lys Asn Val Pro Lys His Leu Glu Val Met Ala Leu Lys Ala Asp Ser
 355 360 365
 25 Ser Asn Asp Ser Ser Ser
 370 375 380
 30 Ser Ser Asp Ser Ser Asp Asp Glu Gly Ser Arg Lys Lys Lys Thr Lys
 385 390 395 400
 35 Lys Leu Lys Thr Pro Asp Lys Lys Lys Lys Gln Lys Glu Asp Glu Lys
 405 410 415
 40 Pro Lys Lys Lys Ser Glu Asp Lys Pro Arg Asn Lys Pro Asp Tyr Arg
 420 425 430
 45 Asp Arg Arg Asn Asp Asp Arg Glu Lys Phe Lys Lys Tyr Arg Asn Asn
 435 440 445
 50 Asp Glu Glu Ser His Arg Arg Ser Arg Glu Asp Ala Arg Glu Lys Tyr
 450 455 460
 55 Arg Gly His Glu Glu Arg Arg Ser Asp His Arg Glu Glu Tyr Arg Pro
 465 470 475 480
 60 Arg Glu His Arg Gly Arg Asp Arg Arg
 485

<210> 86
 <211> 2571
 <212> ADN
 <213> Meligethes aeneus

<400> 86

55 ccacacgaat tgactggtta attaaaaata agcacaagaa acgaataaca ctacaatggt 60
 ttgaatttac acaaaaaaaaa aatgtagtc actaccattg tagtgttatt cgtttcttgt 120

60

65

ES 2 811 279 T3

	gcttattttt aattaaccag tcaattcgtg tgggtgtagtg aacaaagggt atagttatga	180
	cgacggattc cgagagaggt tcccctacag ctgCGGctcc acgcagaagc gcctcgaat	240
5	cgccagaacc aaaaaagca aagtacgata agaaagagaa gggcgataaa gatcgcaaga	300
	ggagatccca cagatccaga tctagatcca gggatagaga ccatagggac aaacatggtg	360
	gaaaaaacg ttaccacgac ctggacgacc cttctgaaga ctaccaaga tattatggcg	420
10	aggatagaaa acagaacagt gacagatatt ggtccaagta cccaagaaa gacagggacg	480
	aatatgttat tggtagccg tattatgatg ttgaggaaaa gaaggagaaa aaagaaaaag	540
	aggatgaaaa taaggataaa tccgtcatca ctccaaggga aaggaaaaca gtggacttac	600
15	taacatctcg aacaggtggg gcttatatac ctccagctaa attacgtatg atgcaggtg	660
	agataactga taaatcatca gctgcatatc aaagaattgc ctgggaagct ttaaaaaagt	720
	ccattcatgg ttacatcaac aaaattaaca cttccaatat tggcttatt gctagagaat	780
20	tactgcatga aaacattgta agaggtagag gtttgctgtg taaatctata atacaagcac	840
	aggcagcttc cccgacgttc accaatgttt atgcagcttt agttgcagtc ataaattcaa	900
25	aattcccaa cattggagaa ctgttactga aaaggttgg tttgcagttt aaaaggggtt	960
	tcaagcagaa caacaagtct atctgtatat cggtgctac ctttgtcgcg catttagtaa	1020
	accaaagagt ggcccacgaa attttagcat tggaaattct tactttactt gttgagtccc	1080
30	ccacagatga ttcagtggaa gtagcaattt cgtttttgaa ggaaagtgg caaaaactca	1140
	ctgaggtgtc gagtaaaggt atcaatgcca tatttgagat gttgaggaat attctgcatg	1200
	aaggacagtt ggagaagaga atacagtaca tgattgaagt catgttcaa gttcggaaag	1260
35	atggtttcaa ggatcatgct gctgttactg aagaactaga tattgttgaa gaggaagatc	1320
	agtttactca cctaatacaca ttggatgatg ttaaacaagc taactcagag gatataatga	1380
	atgtgtttaa atttgatgat aaatatgagg aaaatgaggg taaatacaaa actttaagta	1440
40	aggaaattct ccagtcagac agtgaatcag gcgaatctgg ttcagagggg tctgaagaag	1500
	actcgaaga tgaagaaggt gaagaagatg aaacaaaaa tcaaaccatt attgataaca	1560
45	cagaaactaa ttaatcacc ttaaggagaa ccatctatct cacaatacaa tccagtttg	1620
	attttgagga atgtgccat aaattgatga aatggagat caaacctgga caagagattg	1680
	aattgtgtca catgttcctt gattgttgcg ctgaacagcg tacctacgaa aaattcttcg	1740
50	gcctcctctc gcagcgcttc tgccaaataa acaagacttt catcgaaccg ttccaacaaa	1800
	tttcaaga tacctattcc acaactcaca gacttgacgc caatcgattg agaaacgta	1860
	gcaaattctt cgcgattta ttgttcaccg acgccatcgg ctgggaagtg ctcgatatca	1920
55	tgaattaaa cgaggaagac accaacagtt ccagcaggat ttttatcaag atttgttcc	1980

60

65

ES 2 811 279 T3

5 aggagttgtc cgaatatatg ggattagcga agttgaataa aaggctaaag gatgaaactt 2040
 tacaggaata ttctcgggg ctatttcga gggataacc gaagaacacg cgtttcgcca 2100
 tcaatTTTTT cacgtcgatc ggtttaggag gtctaacgga cgagttgagg gagcacttga 2160
 aaaacgtgcc aaaacatctg gaagtgatgg ctttgaaagc agattcgagc agctctagca 2220
 gcagtagcag cagttccagt aacgattcca gcagcagttc agattcttcc gatgacgagg 2280
 10 gttccaggaa gaagaaaaca aaaaaattga aaaccccgga caaaaagaag aaacagaaag 2340
 aagatgaaaa acccaaaaag aaaagcgagg ataaaccgag gaacaaacca gactatagag 2400
 ataggagaaa cgacgacagg gaaaagtta aaaaatacag aaacaacgac gaagaaagcc 2460
 15 acagaagaag cagagaagat gcaagagaaa aatacagagg tcacgaggaa agaagacgag 2520
 gccgagaaga ccaaacgcga agaggacaag accaagttcc aaggtttgtg c 2571

20 <210> 87
 <211> 798
 <212> PRT
 <213> Meligethes aeneus

25 <400> 87

1	Met	Thr	Thr	Asp	Ser	Glu	Arg	Gly	Ser	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Pro	Arg
					5					10					15	
30	Arg	Ser	Ala	Ser	Lys	Ser	Pro	Glu	Pro	Lys	Lys	Ala	Lys	Tyr	Asp	Lys
				20					25					30		
35	Lys	Glu	Lys	Gly	Asp	Lys	Asp	Arg	Lys	Arg	Arg	Ser	His	Arg	Ser	Arg
			35					40					45			
40	Ser	Arg	Ser	Arg	Asp	Arg	Asp	His	Arg	Asp	Lys	His	Gly	Gly	Lys	Lys
		50					55					60				
45	Arg	Tyr	His	Asp	Leu	Asp	Asp	Pro	Ser	Glu	Asp	Tyr	Pro	Arg	Tyr	Tyr
	65					70					75					80
50	Gly	Glu	Asp	Arg	Lys	Gln	Asn	Ser	Asp	Arg	Tyr	Trp	Ser	Lys	Tyr	Pro
					85					90					95	
55	Lys	Lys	Asp	Arg	Asp	Glu	Tyr	Val	Ile	Gly	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Val
				100					105					110		
60	Glu	Glu	Lys	Lys	Glu	Lys	Lys	Glu	Lys	Glu	Asp	Glu	Asn	Lys	Asp	Lys
			115					120					125			
65	Ser	Val	Ile	Thr	Pro	Arg	Glu	Arg	Lys	Thr	Val	Asp	Leu	Leu	Thr	Ser
		130					135					140				

ES 2 811 279 T3

Arg Thr Gly Gly Ala Tyr Ile Pro Pro Ala Lys Leu Arg Met Met Gln
 145 150 155 160
 5 Ala Glu Ile Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ala Tyr Gln Arg Ile Ala Trp
 165 170 175
 10 Glu Ala Leu Lys Lys Ser Ile His Gly Tyr Ile Asn Lys Ile Asn Thr
 180 185 190
 15 Ser Asn Ile Gly Leu Ile Ala Arg Glu Leu Leu His Glu Asn Ile Val
 195 200 205
 20 Arg Gly Arg Gly Leu Leu Cys Lys Ser Ile Ile Gln Ala Gln Ala Ala
 210 215 220
 25 Ser Pro Thr Phe Thr Asn Val Tyr Ala Ala Leu Val Ala Val Ile Asn
 225 230 235 240
 30 Ser Lys Phe Pro Asn Ile Gly Glu Leu Leu Lys Arg Leu Val Leu
 245 250 255
 35 Gln Phe Lys Arg Gly Phe Lys Gln Asn Asn Lys Ser Ile Cys Ile Ser
 260 265 270
 40 Ala Ala Thr Phe Val Ala His Leu Val Asn Gln Arg Val Ala His Glu
 275 280 285
 45 Ile Leu Ala Leu Glu Ile Leu Thr Leu Leu Val Glu Ser Pro Thr Asp
 290 295 300
 50 Asp Ser Val Glu Val Ala Ile Ser Phe Leu Lys Glu Ser Gly Gln Lys
 305 310 315 320
 55 Leu Thr Glu Val Ser Ser Lys Gly Ile Asn Ala Ile Phe Glu Met Leu
 325 330 335
 60 Arg Asn Ile Leu His Glu Gly Gln Leu Glu Lys Arg Ile Gln Tyr Met
 340 345 350
 65 Ile Glu Val Met Phe Gln Val Arg Lys Asp Gly Phe Lys Asp His Ala
 355 360 365
 70 Ala Val Thr Glu Glu Leu Asp Ile Val Glu Glu Glu Asp Gln Phe Thr
 370 375 380
 75 His Leu Ile Thr Leu Asp Asp Val Lys Gln Ala Asn Ser Glu Asp Ile
 385 390 395 400

ES 2 811 279 T3

Leu Asn Val Phe Lys Phe Asp Asp Lys Tyr Glu Glu Asn Glu Gly Lys
 405 410 415
 5 Tyr Lys Thr Leu Ser Lys Glu Ile Leu Gln Ser Asp Ser Glu Ser Gly
 420 425 430
 10 Glu Ser Gly Ser Glu Gly Ser Glu Glu Asp Ser Glu Asp Glu Glu Gly
 435 440 445
 15 Glu Glu Asp Glu Thr Lys Asn Gln Thr Ile Ile Asp Asn Thr Glu Thr
 450 455 460
 20 Asn Leu Ile Thr Leu Arg Arg Thr Ile Tyr Leu Thr Ile Gln Ser Ser
 465 470 475 480
 25 Leu Asp Phe Glu Glu Cys Ala His Lys Leu Met Lys Met Glu Ile Lys
 485 490 495
 30 Pro Gly Gln Glu Ile Glu Leu Cys His Met Phe Leu Asp Cys Cys Ala
 500 505 510
 35 Glu Gln Arg Thr Tyr Glu Lys Phe Phe Gly Leu Leu Ser Gln Arg Phe
 515 520 525
 40 Cys Gln Ile Asn Lys Thr Phe Ile Glu Pro Phe Gln Gln Ile Phe Lys
 530 535 540
 45 Asp Thr Tyr Ser Thr Thr His Arg Leu Asp Ala Asn Arg Leu Arg Asn
 545 550 555 560
 50 Val Ser Lys Phe Phe Ala His Leu Leu Phe Thr Asp Ala Ile Gly Trp
 565 570 575
 55 Glu Val Leu Asp Ile Met Lys Leu Asn Glu Glu Asp Thr Asn Ser Ser
 580 585 590
 60 Ser Arg Ile Phe Ile Lys Ile Leu Phe Gln Glu Leu Ser Glu Tyr Met
 595 600 605
 65 Gly Leu Ala Lys Leu Asn Lys Arg Leu Lys Asp Glu Thr Leu Gln Glu
 610 615 620
 Tyr Phe Ala Gly Leu Phe Pro Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Arg Phe
 625 630 635 640
 Ala Ile Asn Phe Phe Thr Ser Ile Gly Leu Gly Gly Leu Thr Asp Glu

ES 2 811 279 T3

					645						650						655
5	Leu	Arg	Glu	His	Leu	Lys	Asn	Val	Pro	Lys	His	Leu	Glu	Val	Met	Ala	
				660					665					670			
10	Leu	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
			675					680						685			
15	Asn	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Asp	Glu	Gly	Ser	Arg	
		690					695					700					
20	Lys	Lys	Lys	Thr	Lys	Lys	Leu	Lys	Thr	Pro	Asp	Lys	Lys	Lys	Lys	Gln	
	705					710					715					720	
25	Lys	Glu	Asp	Glu	Lys	Pro	Lys	Lys	Lys	Ser	Glu	Asp	Lys	Pro	Arg	Asn	
					725					730					735		
30	Lys	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp	Arg	Arg	Asn	Asp	Asp	Arg	Glu	Lys	Phe	Lys	
				740					745					750			
35	Lys	Tyr	Arg	Asn	Asn	Asp	Glu	Glu	Ser	His	Arg	Arg	Ser	Arg	Glu	Asp	
			755					760					765				
40	Ala	Arg	Glu	Lys	Tyr	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Glu	
	770						775						780				
45	Asp	Gln	Thr	Arg	Arg	Gly	Gln	Asp	Gln	Val	Pro	Arg	Phe	Val			
	785					790					795						
50	<210>	88															
55	<211>	2512															
60	<212>	ADN															
65	<213>	Meligethes aeneus															
70	<400>	88															
75	aaatgtagtc	actaccattg	tagtgttatt	cgtttcttgt	gcttatTTTT	aattaaccag											60
80	tcaattcgtg	tggtgtagtg	aacaagggtt	atagttatga	cgacggattc	cgagagaggt											120
85	tcccctacag	ctgCGGctcc	acgcagaagc	gcctcgaaat	cgccagaacc	aaaaaaagca											180
90	aagtacgata	agaaagagaa	gggcgataaa	gatcgcaaga	ggagatccca	cagatccaga											240
95	tctagatcca	gggatagaga	ccatagggac	aaacatggtg	gaaaaaaacg	ttaccacgac											300
100	ctggacgacc	cttctgaaga	ctacccaaga	tattatggcg	aggatagaaa	acagaacagt											360
105	gacagatatt	ggtccaagta	cccaaaagaa	agacaggac	gaatatgta	ttgtaaccg											420
110	gtattatgat	gttgaggaaa	agaaggagaa	aaaggaaaa	gaggatgaaa	ataaggataa											480
115	atccgtcatt	actccaaggg	aaaggaaaac	agtggactta	ctaacatctc	gaacaggtgg											540

ES 2 811 279 T3

ggcttatata cctccagcta aattacgtat gatgcaggct gagataactg ataaatcatc 600
 agctgcatat caaagaattg cctgggaagc tttaaaaaag tccattcatg gttacatcaa 660
 5 caaaattaac acttccaata ttggctcttat tgctagagaa ttactgcatg aaaacattgt 720
 aagaggtaga ggtttgctgt gtaaactctat aatacaagca caggcagctt ccccgacgtt 780
 caccaatggt tatgcagctt tagttgcagt cataaattca aaattcccca acattggaga 840
 10 actgttactg aaaaggttgg ttttgcagtt taaaaggggt ttcaagcaga acaacaagtc 900
 tatctgtata toggctgcta cctttgtcgc gcatttagta aaccaagag tggctcatga 960
 aattttagca ttggaaattc ttactttact tgttgagtcc cccacagatg attcagtaga 1020
 15 agtgagcaga acaacaagtc tatctgtata tcggctgcta cctttgtcgc gcatttagta 1080
 aaccaagag tggcccacga aattttagca ttggaaattc ttactttact tgttgagtcc 1140
 cccacagatg attcagtgga agtagcaatt tcgtttttga aggaaagtgg tcaaaaactc 1200
 20 actgaggtgt cgagtaaagg tatcaatgcc atatttgaga tgttgaggaa tattctgcat 1260
 gaaggacagt tggagaagag aatacagtac atgattgaag tcatgttcca agttcgaaa 1320
 gatggtttca aggatcatgc tgctgttact gaagaactag atattgttga agaggaagat 1380
 25 cagtttactc acctaatac attggatgat gtaaacaag ctaactcaga ggatatattg 1440
 aatgtgttta aatttgatga taaatatgag gaaaatgagg gtaaatatac aactttaagt 1500
 aaggaaattc tccagtcaga cagtgaatca ggcgaatctg gttcagaggg gtctgaagaa 1560
 30 gactcggag atgaagaagg tgaagaagat gaaacaaaa atcaaaccat tattgataac 1620
 acagaaacta atttaatac cttaaggaga accatctatc tcacaataca atccagttt 1680
 gattttgagg aatgtgccc taaattgatg aaaatggaga tcaaacctgg acaagagatt 1740
 35 gaattgtgtc acatgttctc tgattgttgc gctgaacagc gtacctacga aaaattcttc 1800
 ggcctcctct cgcagcgtt ctgccaata aacaagactt tcatcgaacc gttccaacaa 1860
 attttcaaag atacctatc cacaactcac agacttgacg ccaatcgatt gagaacgtt 1920
 40 agcaaattct togcgcatth attgttcacc gacgccatcg gctgggaagt gctcgatata 1980
 atgaaattaa acgaggaaga caccaacagt tccagcagga ttttcatcaa gatthtgtt 2040
 45 caggagtgtt ccgaatata gggattagcg aagttgaata aaaggctaaa ggatgaaact 2100
 ttacaggaat atttcgctgg gctatttccg agggataacc cgaagaacac gcgtttcgcc 2160
 atcaatthtt tcacgtcgat cggtttagga ggtctaaccg acgagttgag ggagcacttg 2220
 50 aaaaacgtgc caaaacatct ggaagtgatg gctttgaaag cagattcgag cagctctagc 2280
 agcagtagca gcagttccag taacgattcc agcagcagtt cagattcttc cgatgacgag 2340
 ggttccagga agaagaaaac aaaaaattg aaaaccccg acaaaaagaa gaaacagaaa 2400
 55 gaagatgaaa aacccaaaaa gaaaagcgag gataaacga ggaacaaagt aatgggtgat 2460
 aagaatatag aaacagaaga tacacaagga gttgaggaca caaaaagac tg 2512

60 <210> 89
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> Meligethes aeneus

65 <400> 89

ES 2 811 279 T3

1 Met Leu Arg Asn Ile Leu His Glu Gly Gln Leu Glu Lys Arg Ile Gln
 5 Tyr Met Ile Glu Val Met Phe Gln Val Arg Lys Asp Gly Phe Lys Asp
 10 His Ala Ala Val Thr Glu Glu Leu Asp Ile Val Glu Glu Glu Asp Gln
 15 Phe Thr His Leu Ile Thr Leu Asp Asp Val Lys Gln Ala Asn Ser Glu
 20 Asp Ile Leu Asn Val Phe Lys Phe Asp Asp Lys Tyr Glu Glu Asn Glu
 25 Gly Lys Tyr Lys Thr Leu Ser Lys Glu Ile Leu Gln Ser Asp Ser Glu
 30 Ser Gly Glu Ser Gly Ser Glu Gly Ser Glu Glu Asp Ser Glu Asp Glu
 35 Glu Gly Glu Glu Asp Glu Thr Lys Asn Gln Thr Ile Ile Asp Asn Thr
 40 Glu Thr Asn Leu Ile Thr Leu Arg Arg Thr Ile Tyr Leu Thr Ile Gln
 45 Ser Ser Leu Asp Phe Glu Glu Cys Ala His Lys Leu Met Lys Met Glu
 50 Ile Lys Pro Gly Gln Glu Ile Glu Leu Cys His Met Phe Leu Asp Cys
 55 Cys Ala Glu Gln Arg Thr Tyr Glu Lys Phe Phe Gly Leu Leu Ser Gln
 60 Arg Phe Cys Gln Ile Asn Lys Thr Phe Ile Glu Pro Phe Gln Gln Ile
 65

ES 2 811 279 T3

Phe Lys Asp Thr Tyr Ser Thr Thr His Arg Leu Asp Ala Asn Arg Leu
 210 215 220
 5 Arg Asn Val Ser Lys Phe Phe Ala His Leu Leu Phe Thr Asp Ala Ile
 225 230 235 240
 10 Gly Trp Glu Val Leu Asp Ile Met Lys Leu Asn Glu Glu Asp Thr Asn
 245 250 255
 15 Ser Ser Ser Arg Ile Phe Ile Lys Ile Leu Phe Gln Glu Leu Ser Glu
 260 265 270
 20 Tyr Met Gly Leu Ala Lys Leu Asn Lys Arg Leu Lys Asp Glu Thr Leu
 275 280 285
 25 Gln Glu Tyr Phe Ala Gly Leu Phe Pro Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr
 290 295 300
 30 Arg Phe Ala Ile Asn Phe Phe Thr Ser Ile Gly Leu Gly Gly Leu Thr
 305 310 315 320
 35 Asp Glu Leu Arg Glu His Leu Lys Asn Val Pro Lys His Leu Glu Val
 325 330 335
 40 Met Ala Leu Lys Ala Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 340 345 350
 45 Ser Ser Asn Asp Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Asp Asp Glu Gly
 355 360 365
 50 Ser Arg Lys Lys Lys Thr Lys Lys Leu Lys Thr Pro Asp Lys Lys Lys
 370 375 380
 55 Lys Gln Lys Glu Asp Glu Lys Pro Lys Lys Lys Ser Glu Asp Lys Pro
 385 390 395 400
 60 Arg Asn Lys Val Asn Gly Asp Lys Asn Ile Glu Thr Glu Asp Thr Gln
 405 410 415
 65 Gly Val Glu Asp Thr Lys Lys Thr
 420

<210> 90
 <211> 489
 <212> ADN
 <213> Meligethes aeneus

<400> 90

gttccttgat tggtgctg aacagcgtac ctacgaaaa ttcttcggcc tcctctcgca

60

60

65

ES 2 811 279 T3

gcgcttctgc caaataaaca agactttcat cgaaccgttc caacaaattt tcaaagatac 120
 ctattccaca actcacagac ttgacgcaa tcgattgaga aacgttagca aattcttcgc 180
 5 gcatttattg ttcaccgacg ccatcggctg ggaagtgtc gatatcatga aattaaacga 240
 ggaagacacc aacagttcca gcaggatatt catcaagatt ttgttccagg agttgtccga 300
 atatatggga ttagcgaagt tgaataaaag gctaaaggat gaaactttac aggaatattt 360
 10 cgcggggcta tttccgaggg ataaccgaa gaacacgctt ttcgcatca attttttcac 420
 gtcgatcggc ttaggaggtc taacggacga gttgaggag cacttgaaaa acgtgcaaaa 480
 acatctgga 489
 15
 <210> 91
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> cebador directo ncm reg1
 25
 <400> 91
 taatagcact cactataggg agagttcctt gattgtgcg ctga 44
 30
 <210> 92
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso ncm reg1
 35
 <400> 92
 taatagcact cactataggg agatccagat gtttggcac gtttt 45
 40
 <210> 93
 <211> 2599
 <212> ADN
 <213> Meligethes aeneus
 <400> 93
 45 tttttgttac caaccaaacg gcctaaattt ccctagataa cctaaaataa aaacaacact 60
 tcgtcatttg tgtaaattca acaaatgta gtcactacca ttgtagtgtt attcgtttct 120
 tgtgcttatt tttaattaac cagtcaattc gtgtggtgta gtgaacaaag gttatagtta 180
 50 tgacgacgga ttccgagaga ggttccccta cagctgcggc tccacgcaga agcgcctcga 240
 aatcgccaga accaaaaaaa gcaaagtacg ataagaaaga gaagggcgat aaagatcgca 300
 agaggagatc ccacagatcc agatctagat ccagggatag agaccatagg gacaaacatg 360
 55 gtggaaaaaa acgttaccac gacctggacg acccttctga agactacca agatattatg 420
 gcgaggatag aaaacagaac agtgacagat attggtccaa gtacccaaag aaagacaggg 480
 60
 65

ES 2 811 279 T3

	acgaatatgt tattggtagc cggattatg atggtgagga aaagaaggag aaaaaggaaa	540
	aagaggatga aaataaggat aaatccgtca ttactccaag ggaaaggaaa acagtggact	600
5	tactaacatc tcgaacaggt ggggcttata tacctccagc taaattacgt atgatgcagg	660
	ctgagataac tgataaatca tcagctgcat atcaaagaat tgcctgggaa gctttaaaaa	720
	agtccattca tggttacatc aacaaaatta aacttccaa tattggtcctt attgctagag	780
10	aattactgca tgaaaacatt gtaagaggta gaggtttgct gtgtaaatct ataatacaag	840
	cacaggcagc ttccccgaca ttcaccaatg tttatgcagc tttagttgca gtcataaatt	900
	caaaattccc caacattgga gaactgttac tgaaaagggt ggttttgagc tttaaaaggg	960
15	gtttcaagca gaacaacaag tctatctgta tatcggctgc tacctttgtc gcgcatttag	1020
	taaaccaaaag agtggcccat gaaattttag cattggaaat tcttacttta cttggtgagt	1080
	ccccacaga tgattcagtg gaagtagcaa tttcgttttt gaaggaaagt ggtcaaaaac	1140
20	tcactgaggt gtcgagtaaa ggtatcaatg ccatatttga gatgttgagg aatattctgc	1200
	atgaaggaca gttggagaag agaatacagt acatgattga agtcatgttc caagttcgga	1260
25	aagatggttt caaggatcat gctgctgta ctgaagaact agatattggt gaagaggaag	1320
	atcagtttac tcacctaatc acattggatg atgttaaaca agctaactca gaggatatat	1380
	tgaatgtgtt taaatttgat gataaatatg aggaaaatga gggtaaatac aaaactttaa	1440
30	gtaaggaaat tctccagtca gacagtgaat caggcgaatc tggttcagag gggctgag	1500
	aagactcggga agatgaagaa ggtgaagaag atgaaaccaa aatcaaacc attattgata	1560
	acacagaaac taatttaate accttaagga gaaccatcta tctcacaata caatccagtt	1620
35	tggattttga ggaatgtgcc cataaattga tgaaaatgga gatcaaacct ggacaagaga	1680
	ttgaattgtg tcacatgttc cttgattggt gcgctgaaca gcgtacctac gaaaaattct	1740
	tcggcctcct ctcgcagcgc ttctgccaaa taaacaagac tttcatcgaa ccgttccaac	1800
40	aaattttcaa agatacctat tccacaactc acagacttga cgccaatcga ttgagaaacg	1860
	ttagcaaatt cttcgcgcat ttattgttca ccgacgccat cggctgggaa gtgctcgata	1920
45	tcatgaaatt aaacgaggaa gacaccaaca gttccagcag gattttcatc aagattttgt	1980
	tccaggagtt gtcogaatat atgggattag cgaagttgaa taaaaggcta aaggatgaaa	2040
	ctttacagga atatctcgcg gggctatttc cgagggataa cccgaagaac acgcgtttcg	2100
50	ccatcaattt tttcacgtcg atcggtttag gaggtctaac ggacgagttg agggagcact	2160
	tgaaaaacgt gccaaaacat ctggaagtga tggctttgaa agcagattcg agcagctcta	2220
	gcagcagtag cagcagttcc agtaacgatt ccagcagcag ttcagattct tccgatgacg	2280
55	agggttccag gaagaagaaa acaaaaaaat tgaaaacccc ggacaaaaag aagaacaga	2340
	aagaagatga aaaaccctaaa aagaaaagcg aggataaacc gaggaacaaa ccagactata	2400
60	gagatagaag aaacgacgac agggaaaagt ttaaaaaata cagaaacaac gacgaagaaa	2460
	gccacagaag aagcagagaa gatgcaagag aaaaatacag aggtcacgag gaaagaagaa	2520
	gcgaccacag agaagaatac cggccgagag aacatagagg tagagataga cgttagttgt	2580
65	ataataatgt atatTTTTT	2599

ES 2 811 279 T3

<210> 94
 <211> 798
 <212> PRT
 <213> Meligethes aeneus

5

<400> 94

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Met Thr Thr Asp Ser Glu Arg Gly Ser Pro Thr Ala Ala Ala Pro Arg
 1 5 10 15

Arg Ser Ala Ser Lys Ser Pro Glu Pro Lys Lys Ala Lys Tyr Asp Lys
 20 25 30

Lys Glu Lys Gly Asp Lys Asp Arg Lys Arg Arg Ser His Arg Ser Arg
 35 40 45

Ser Arg Ser Arg Asp Arg Asp His Arg Asp Lys His Gly Gly Lys Lys
 50 55 60

Arg Tyr His Asp Leu Asp Asp Pro Ser Glu Asp Tyr Pro Arg Tyr Tyr
 65 70 75 80

Gly Glu Asp Arg Lys Gln Asn Ser Asp Arg Tyr Trp Ser Lys Tyr Pro
 85 90 95

Lys Lys Asp Arg Asp Glu Tyr Val Ile Gly Ser Arg Tyr Tyr Asp Val
 100 105 110

Glu Glu Lys Lys Glu Lys Lys Glu Lys Glu Asp Glu Asn Lys Asp Lys
 115 120 125

Ser Val Ile Thr Pro Arg Glu Arg Lys Thr Val Asp Leu Leu Thr Ser
 130 135 140

Arg Thr Gly Gly Ala Tyr Ile Pro Pro Ala Lys Leu Arg Met Met Gln
 145 150 155 160

Ala Glu Ile Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ala Tyr Gln Arg Ile Ala Trp
 165 170 175

Glu Ala Leu Lys Lys Ser Ile His Gly Tyr Ile Asn Lys Ile Asn Thr

ES 2 811 279 T3

				180					185					190			
5	Ser	Asn	Ile	Gly	Leu	Ile	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	His	Glu	Asn	Ile	Val	
			195					200					205				
10	Arg	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu	Cys	Lys	Ser	Ile	Ile	Gln	Ala	Gln	Ala	Ala	
		210					215					220					
15	Ser	Pro	Thr	Phe	Thr	Asn	Val	Tyr	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Ile	Asn	
	225					230					235				240		
20	Ser	Lys	Phe	Pro	Asn	Ile	Gly	Glu	Leu	Leu	Leu	Lys	Arg	Leu	Val	Leu	
					245					250					255		
25	Gln	Phe	Lys	Arg	Gly	Phe	Lys	Gln	Asn	Asn	Lys	Ser	Ile	Cys	Ile	Ser	
				260					265					270			
30	Ala	Ala	Thr	Phe	Val	Ala	His	Leu	Val	Asn	Gln	Arg	Val	Ala	His	Glu	
			275					280					285				
35	Ile	Leu	Ala	Leu	Glu	Ile	Leu	Thr	Leu	Leu	Val	Glu	Ser	Pro	Thr	Asp	
		290					295					300					
40	Asp	Ser	Val	Glu	Val	Ala	Ile	Ser	Phe	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Gln	Lys	
	305					310					315					320	
45	Leu	Thr	Glu	Val	Ser	Ser	Lys	Gly	Ile	Asn	Ala	Ile	Phe	Glu	Met	Leu	
					325					330					335		
50	Arg	Asn	Ile	Leu	His	Glu	Gly	Gln	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Gln	Tyr	Met	
				340					345					350			
55	Ile	Glu	Val	Met	Phe	Gln	Val	Arg	Lys	Asp	Gly	Phe	Lys	Asp	His	Ala	
			355					360					365				
60	Ala	Val	Thr	Glu	Glu	Leu	Asp	Ile	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Gln	Phe	Thr	
		370					375						380				
65	His	Leu	Ile	Thr	Leu	Asp	Asp	Val	Lys	Gln	Ala	Asn	Ser	Glu	Asp	Ile	
	385					390					395				400		
70	Leu	Asn	Val	Phe	Lys	Phe	Asp	Asp	Lys	Tyr	Glu	Glu	Asn	Glu	Gly	Lys	
					405					410					415		
75	Tyr	Lys	Thr	Leu	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	Gln	Ser	Asp	Ser	Glu	Ser	Gly	
				420					425					430			

ES 2 811 279 T3

	Asn	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Asp	Glu	Gly	Ser	Arg
	690						695				700					
5	Lys	Lys	Lys	Thr	Lys	Lys	Leu	Lys	Thr	Pro	Asp	Lys	Lys	Lys	Lys	Gln
	705				710						715					720
10	Lys	Glu	Asp	Glu	Lys	Pro	Lys	Lys	Lys	Ser	Glu	Asp	Lys	Pro	Arg	Asn
					725					730					735	
15	Lys	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp	Arg	Arg	Asn	Asp	Asp	Arg	Glu	Lys	Phe	Lys
				740					745					750		
20	Lys	Tyr	Arg	Asn	Asn	Asp	Glu	Glu	Ser	His	Arg	Arg	Ser	Arg	Glu	Asp
			755					760					765			
25	Ala	Arg	Glu	Lys	Tyr	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Arg	Arg	Ser	Asp	His	Arg
	770						775						780			
30	Glu	Glu	Tyr	Arg	Pro	Arg	Glu	His	Arg	Gly	Arg	Asp	Arg	Arg		
	785					790					795					

<210> 95
 <211> 1658
 <212> ARN
 <213> Meligethes aeneus

35	gcaauuucgu	uuuugaagga	aaguggucaa	aaacucacug	aggugucgag	uaaagguauc	60
	aaugccauau	uugagauguu	gaggaauauu	cugcaugaag	gacaguugga	gaagagaaua	120
	caguacauga	uugaagucan	guuccaaguu	cggaaagau	guuucagga	ucaugcugcu	180
	guuacugaag	aacuagauau	uguugaagag	gaagaucagu	uuacucaccu	aaucacauug	240
40	gaugauguua	aacaagcuua	cucagaggau	auauugaau	uguuuuuuuu	ugaugauaaa	300
	uauaggaaa	augaggguaa	auacaaaacu	uuuaguuuag	aaauucucca	gucagacagu	360
	gaucagggcg	aaucugguuc	agaggggucu	gaagaagacu	cggaaagau	agaaggugaa	420
45	gaagaugaaa	ccaaaaauca	aaccuuuuuu	gauaacacag	aaacuuuuuu	aaucaccuua	480
	aggagaacca	ucuaucucac	aaucacuuuc	aguuuggauu	uugaggauug	ugcccauaaa	540
50	uugaugaaaa	uggagaucan	accuggacaa	gagauugaau	ugugucacau	guuccuugau	600
	uguugcgug	aacagcgua	cuacgaaaa	uuuucggcc	uccucucgca	gcgcuucugc	660
	caauuuuaca	agacuuucan	cgaaccguuc	caacuuuuuu	ucaagauuc	cuauuccaca	720
55	acucacagac	uugacgcaa	ucgauugaga	aacguuagca	aaucuuucgc	gcauuuuuug	780
	uucaccgacg	ccaucggcug	ggaagugcuc	gauaucauga	aauuuuuacg	ggaagacacc	840

60

65

ES 2 811 279 T3

aacaguucca gcaggauuuu caucaagauu uuguuccagg aguuguccga auauauggga 900
 uuagcgaagu ugaauaaaag gcuaaaggau gaaacuuuac aggaauuuu cgcggggcu 960
 5 uuuccgaggg auaacccgaa gaacacgcbu uucgccauca auuuuuucac gucgauccgu 1020
 uuaggagguc uaacggacga guugagggag cacuugaaaa acgugccaaa acaucuggaa 1080
 gugauggcuu ugaaagcaga uucgagcagc ucuagcagca guagcagcag uuccaguaac 1140
 10 gauuccagca gcaguucaga uucuuuccgau gacgaggguu ccaggaagaa gaaaacaaaa 1200
 aauugaaaa ccccgacaa aaagaagaaa cagaaagaag augaaaaacc caaaaagaaa 1260
 agcggaggua aaccgaggaa caaacagac uauagagaua gaagaaacga cgacaggaa 1320
 15 aaguuuuuuu aaucagaaa caacgacgaa gaaagccaca gaagaagcag agaagaugca 1380
 agagaaaaau acagagguca cgaggaaaga agaagcgacc acagagaaga auaccggccg 1440
 20 agagaacaua gagguagaga uagacguuag uuguauaua auguauuuu uuucguuuu 1500
 aauaaaauaa auuauacauu uuauaguguu ucggagcauu caccaagcaa ggguuuuacu 1560
 uuucggauagc aaugguguag uacguuuuug aaggugucca cacacaccaa gccgguuuua 1620
 25 ucuaaaucua gagcuaucuu ccaaaagucu ucaaagga 1658

<210> 96

<211> 2571

<212> ARN

30 <213> Meligethes aeneus

<400> 96

ccacacgaau ugacugguua auuuuuuuuu agcacaagaa acgaauaaca cuacaauggu 60
 35 uugauuuuac acaaaaaaaa aaauguaguc acuaccuug uaguguuuuu cguuuuuuuu 120
 gcuuuuuuuu auuuuaccag ucauuucgug ugguguagug aacaaagguu auaguuauga 180
 40 cgacggauuc cgagagaggu ucccuacag cugcgccucc acgcagaagc gccucgaaau 240
 cgccagaacc aaaaaagca aaguacgaa agaaagagaa gggcgauaaa gaucgcaaga 300
 ggagauccea cagaucaga ucuagaacca gggauagaga ccuagggac aaacauggug 360
 45 gaaaaaacg uuaccagcag cugcagcagc cuucugaaga cuaccaga uauuauugcg 420
 aggauagaaa acagaacagu gacagauuuu gguccaagua cccaaagaaa gacagggagc 480
 aauauguuuu uggugcccg uauuauaug uugaggaaaa gaaggagaaa aaagaaaaag 540
 50 aggaugaaaa uaaggauaaa uccgucauca cuccaaggga aaggaaaaca guggacuuc 600
 uaacaucucg aacagguggg gcuuauuac cuccagcuua auuacguaug augcagcgug 660
 agauaacuga uaaucacua gcugcauauc aaagaauugc cugggaagcu uuuuuuuuuu 720
 55 ccuuuauug uuacaucaac aaaaaaaca cuuccauuu uggucuuuuu gcuagagaau 780
 uacugcauga aaacaugua agagguagag guuugcugug uaaucuaaa auacaagcag 840

60

65

ES 2 811 279 T3

aggcagcuuc cccgacguuc accaauguuu augcagcuuu aguugcaguc auaaaaucaa 900
 aauuccccaa cauuggagaa cuguuacuga aaagguuggu uuugcaguuu aaaagggguu 960
 5 ucaagcagaa caacaagucu aucuguauau cggcugcuac cuuugucgcg cauuuaguaa 1020
 accaaagagu ggcccacgaa auuuuagcau uggaaaucuu uacuuuacuu guugaguccc 1080
 ccacagauga uucaguggaa guagcaauuu cguuuuugaa ggaaaguggu caaaaacuca 1140
 10 cugagguguc gaguaaaggu aucaaugcca uuuuugagau guugaggaa auucugcaug 1200
 aaggacaguu ggagaagaga auacaguaca ugauugaagu cauguuccaa guucggaaag 1260
 augguuucua ggaucaugcu gcuguuacug aagaacuaga uauuguuga gaggaagauc 1320
 15 aguuuacuca ccuaaucaca uuggaugaug uuaaacaagc uaacucagag gauuuuuga 1380
 auguguuuua auuugaugau aaauaugagg aaaaugaggg uaaauacaaa acuuuagua 1440
 20 aggaaauucu ccagucagac agugaaucag gcgaaucugg uucagagggg ucugaagaag 1500
 acucggaaga ugaagaaggu gaagaagaug aaaccaaaa ucaaaccuu auugauaaca 1560
 cagaaacuaa uuuuauacc uuaagagaa ccaucuaucu cacaauacaa uccaguuugg 1620
 25 auuuugagga augugcccau aaauugauga aaauggagau caaacugga caagagauug 1680
 aauuguguca cauguuccuu gauuguugcg cugaacagcg uaccuacgaa aaauucucg 1740
 gccuccucuc gcagcgcuuu ugccaaauaa acaagacuuu caucgaaccg uuccaacaaa 1800
 30 uuuucaaaga uaccuauucc acaacucaca gacuugacgc caaucgauug agaaacguua 1860
 gcaaaucuuu cgcgcauuua uuguuaccg acgccaucgg cugggaagug cucgauauca 1920
 ugaaauuuaa cgaggaagac accaacaguu ccagcaggau uuuuaucaag auuuuguucc 1980
 35 aggaguuguc cgaauauaug ggauuagcga aguugaauaa aaggcuaaag gaugaaacuu 2040
 uacaggaaua uuucgcgggg cuauuuccga gggauaaccc gaagaacacg cguuucgcca 2100
 ucauuuuuuu cacgucgauc gguuuaggag gucuaacgga cgaguugagg gagcacuuga 2160
 aaaacgugcc aaaacaucug gaagugaugg cuuugaaagc agauucgagc agcucugca 2220
 gcaguagcag caguuccagu aacgauucca gcagcaguuc agauucucc gaugacgagg 2280
 45 guuccaggaa gaagaaaaca aaaaauuga aaacccgga caaaaagaag aaacagaaag 2340
 aauguuaaaa acccaaaaag aaaagcgagg auaaaccgag gaacaaacca gacuauagag 2400
 auaggagaaa cgacgacagg gaaaaguua aaaaauacag aaacaacgac gaagaaagcc 2460
 50 acagaagaag cagagaagau gcaagagaaa aaucacagag ucacgaggaa agaagacgag 2520
 gccgagaaga ccaaacgcga agaggacaag accaaguucc aagguuugug c 2571

55 <210> 97
 <211> 2512
 <212> ARN
 <213> Meligethes aeneus

60 <400> 97

65

ES 2 811 279 T3

	aaauguaguc	acuaccuug	uaguguuuu	cguuucuuu	gcuuuuuuu	aaauaacccag	60
	ucaauucgug	ugguguagug	aacaaagguu	auaguuauga	cgacggauuc	cgagagaggu	120
5	uccccuacag	cugcggcucc	acgcagaagc	gccucgaaau	cgccagaacc	aaaaaaagca	180
	aaguacgaua	agaagagaa	gggcgauaaa	gaucgcaaga	ggagauccca	cagauccaga	240
	ucuagaucca	gggauagaga	ccauagggac	aaacauggug	gaaaaaacg	uuaccacgac	300
10	cuggacgacc	cuucugaaga	cuaccaga	uauuauugcg	aggauagaaa	acagaacagu	360
	gacagauuu	gguccaagua	cccaaaagaa	agacagggac	gaauauguua	uugguaaccg	420
	guuuuagau	guugaggaaa	agaaggagaa	aaaggaaaa	gaggauagaa	auaaggauaa	480
15	auccgucuu	acuccaagg	aaaggaaaac	aguggacuua	cuaacaucuc	gaacaggugg	540
	ggcuuuaua	ccuccagcua	aauuacguau	gaugcaggcu	gagauaacug	auaaaaucac	600
	agcugcauu	caaagaauug	ccugggaagc	uuuuuuuuag	uccauucaug	guuacaucaa	660
20	caaaaauaac	acuuccaaua	uuggucuuau	ugcuagagaa	uuacugcaug	aaaacauugu	720
	aagagguaga	gguuugcugu	guaaaaucua	aaucacagca	caggcagcuu	ccccgacguu	780
	caccaauguu	uaugcagcuu	uaguugcagu	cauaaaauca	aaauucccca	acauuggaga	840
25	acuguuacug	aaaagguugg	uuuugcagu	uaaaaggggu	uucaagcaga	acaacaaguc	900
	uauuguaua	ucggcugcua	ccuuugcgc	gcauuuagua	aaccacagag	uggcucauga	960
30	aauuuuagca	uuggaaaauuc	uuacuuuacu	uguugagucc	cccacagaug	auucaguaga	1020
	agugagcaga	acaacaaguc	uauuguaua	ucggcugcua	ccuuugcgc	gcauuuagua	1080
	aaccacagag	uggcccacga	aauuuuagca	uuggaaaauuc	uuacuuuacu	uguugagucc	1140
35	cccacagaug	auucagugga	aguagcauu	ucguuuuuga	aggaaagugg	ucaaaaacuc	1200
	acugagguug	cgaguaaag	uaucaaugcc	auuuuuagaga	uguugaggaa	uauucugcau	1260
	gaaggacagu	uggagaagag	aaucacaguac	augauugaag	ucauguucca	aguucggaaa	1320
40	gaugguuuca	aggaucaugc	ugcuguuacu	gaagaacuag	auuuuuuuga	agaggaagau	1380
	caguuuacuc	accuaaucac	auuggaugau	guuuuuuag	cuaaacucaga	ggauuuuuug	1440
45	aauguuuuu	aauuugauga	uaaaauagag	gaaaauagag	guuuuuuaca	aacuuuuagu	1500
	aaggaaaauuc	uccagucaga	cagugaauca	ggcgaauucg	guucagaggg	gucugaagaa	1560
	gacucggaag	augaagaag	ugaagaagau	gaaacaaaa	aucaaaccau	uauugauaac	1620
50	acagaaaauca	uuuuuuuacac	cuuaaggaga	accaucuauc	ucacaauaca	auccaguuug	1680
	gauuuuaggg	aaugugccca	uuuuuuuag	aaaauaggaga	ucaaacccug	acaagagauu	1740
	gaauuguguc	acauguuccu	ugauuuugc	gcugaacagc	guaccuacga	aaaauuucuc	1800
55	ggccuccucu	cgcagcgcuu	cugccaaaau	aacaagacuu	ucaucgaacc	guuccaaca	1860
60							
65							

ES 2 811 279 T3

5 auuuucaaag auaccuauuc cacaacucac agacuugacg ccaaucgauu gagaacggu 1920
 agcaaaauucu ucgcgcauuu auuguucacc gacgccaucg gcugggaagu gcucgauauc 1980
 augaaauuaa acgaggaaga caccaacagu uccagcagga uuuucaucaa gauuuuguuc 2040
 caggaguugu ccgaauauau gggauuagcg aaguugaaua aaaggcuaaa ggaugaaacu 2100
 uuacaggaau auuucgcggg gcuauuuccg agggauaacc cgaagaacac gcguuucgcc 2160
 10 aucaauuuuu ucacgucgau cgguuuagga ggucuaacgg acgaguugag ggagcacuug 2220
 aaaaacgugc caaaacaucu ggaagugaug gcuuugaaag cagauucgag cagcucuagc 2280
 agcaguagca gcaguuccag uaacgauucc agcagcaguu cagauucuuc cgaugacgag 2340
 15 gguuccagga agaagaaaac aaaaaauug aaaaccccgg acaaaaagaa gaaacagaaa 2400
 gaagaugaaa aacccaaaaa gaaaagcagag gauaaaccga ggaacaaagu aauggugau 2460
 20 aagaauauag aaacagaaga uacacaagga guugaggaca caaaaaagac ug 2512

<210> 98
 <211> 489
 <212> ARN
 <213> Meligethes aeneus

25 <400> 98

30 guuccuugau uguugcgug aacagcguac cuacgaaaaa uucuucggcc uccucucgca 60
 gcgcuucugc caaaauaaca agacuuucau cgaaccguuc caacaaauuu ucaaagauac 120
 cuauuccaca acucacagac uugacgcaa ucgauugaga aacguuagca aaucuucgc 180
 gcauuuuuug uucaccgagc ccaucggcug ggaagugcuc gauaucauga aauuaaacga 240
 35 ggaagacacc aacaguucca gcaggauuuu caucaagauu uuguuccagg aguuguccga 300
 auauauggga uuagcgaagu ugaauaaaag gcuaaaggau gaaacuuuac aggaauuuu 360
 cgcgggggcua uuuccgaggg auaacccgaa gaacacgcu uucgccauga auuuuuucac 420
 40 gucgaucggu uuaggagguac uaacggacga guugagggag cacuugaaaa acgugccaaa 480
 acaucugga 489

45 <210> 99
 <211> 2599
 <212> ARN
 <213> Meligethes aeneus

50 <400> 99

55 uuuuuguuac caaccaaacg gccuaaaauu ccuagauaa ccuaaaaaua aaacaacacu 60
 ucgucauuug uguaaaauca aacaaaugua gucacuacca uuguaguguu auucguuucu 120
 ugugcuuauu uuuuuuuuac cagucuuuuc guugggugua gugaacaaag guuauaguua 180
 ugacgacgga uuccgagaga gguuccccua cagcugcggc uccacgcaga agcgccucga 240

60

65

ES 2 811 279 T3

	aaucgccaga	accaaaaaaa	gcaaaguacg	auaagaaaga	gaagggcgau	aaagaucgca	300
	agaggagauc	ccacagaucc	agaucuagau	ccagggauag	agaccuagg	gacaaacaug	360
5	guggaaaaaa	acguuaccac	gaccuggacg	acccuucuga	agacuacca	agauuuuug	420
	gcgaggauag	aaaacagaac	agugacagau	auugguccaa	guacccaaag	aaagacaggg	480
	acgaaauugu	uauugguagc	cgguuuuug	auguugagga	aaagaaggag	aaaaaggaaa	540
10	aagaggauga	aaauaaggau	aaauccguca	uuacuccaag	ggaaaggaaa	acaguggacu	600
	uacuaacauc	ucgaacaggu	ggggcuuuaa	uaccuccagc	uaaaauacgu	augaugcagc	660
	cugagauaac	ugauaaaauca	ucagcugcau	aucaaagaa	ugccugggaa	gcuuuaaaa	720
15	aguccauuca	ugguuacauc	aacaaaaaua	acacuuccaa	uuuggucuu	auugcuagag	780
	aauuacugca	ugaaaaacau	guaagaggua	gagguuugcu	guguaaaacu	auuuuacaag	840
	cacaggcagc	uuccccgaca	uucaccaaug	uuuauagcag	uuuaguugca	gucuuuuuu	900
20	caaaaauccc	caacuugga	gaacuguuac	ugaaaagggu	gguuuugcag	uuuuuuagg	960
	guuucaagca	gaacaacaag	ucuaucugua	uauccgucg	uaccuuugc	gcgcauuuag	1020
	uaaaccaaag	aguggcccau	gaaauuuuag	cauuggaaa	ucuuacuua	cuuguugagu	1080
25	ccccacaga	ugauucagug	gaaguagcaa	uuucguuuu	gaaggaaaag	ggucaaaaa	1140
	ucacugaggu	gucgaguaaa	gguaucaaug	ccauuuuga	gauguugagg	aaauuucugc	1200
	augaaaggaca	guuggagaag	agaauacagu	acaugauuga	agucauguuc	caaguucgga	1260
30	aagaugguuu	caaggaucau	gcugcuguua	cugaagaacu	agauuuugu	gaagaggaag	1320
	aucaguuuac	ucaccuaauc	acauuggaug	auguuuuuac	agcuuacuca	gaggauuuu	1380
	ugaauguguu	uaaaauugau	gauuuuuuug	aggaaaaua	ggguuuuuac	aaaacuuuu	1440
35	guaaggaaa	ucuccaguca	gacagugaau	caggcgaauc	ugguucagag	gggucugaag	1500
	aagacucgga	agaugaagaa	ggugaagaag	augaaacca	aaaucuaacc	auuuuugau	1560
	acacagaaa	uaauuuuau	accuuuagga	gaaccaucua	ucucacaau	caauccaguu	1620
40	uggauuuuga	ggaaugugcc	cauuuuuuga	ugaaaauuga	gaucaaacu	ggacaagaga	1680
	uugaauugug	ucacauguuc	cuugauuguu	gcgcugaaca	gcguaccuac	gaaaauuuc	1740
	ucggccuccu	cucgcagcgc	uucugccaaa	uaacaagac	uuucaucgaa	ccguuccaac	1800
45	aaauuuucaa	agauaccuau	uccacaacuc	acagacuuga	cgccaaucga	uugagaacg	1860
	uuagcauuu	cuucgcgcau	uuuuuuuuga	ccgacgcca	cggcugggaa	gugcucgaa	1920
50	ucauuuuuu	aaacgaggaa	gacaccaaca	guccagcag	gauuuuucac	aagauuuugu	1980
	uccagaguu	guccgaaau	augggauuag	cgaaguugaa	uaaaaggcu	aaggaugaaa	2040
	uuuacagga	auuuuucg	gggcuuuuuc	cgagggaau	cccgaagaac	acgcguuucg	2100
55	ccaucauuu	uuucacgucg	aucgguuuag	gaggucuaac	ggacgaguug	agggagcacu	2160
60							
65							

ES 2 811 279 T3

	ugaaaaacgu gccaaaacau cuggaaguga uggcuuugaa agcagauucg agcagcucua	2220
	gcagcaguag cagcaguucc aguaacgauu ccagcagcag uucagauucu uccgaugacg	2280
5	agggauccag gaagaagaaa acaaaaaau ugaaaacccc ggacaaaag aagaaacaga	2340
	aagaagauga aaaaccctaaa aagaaaagcg aggauaaacc gaggaacaaa ccagacuua	2400
	gagauagaag aaacgacgac agggaaaagu uaaaaaaaaa cagaaacaac gacgaagaaa	2460
10	gccacagaag aagcagagaa gaugcaagag aaaaauacag aggucacgag gaaagaagaa	2520
	gcgaccacag agaagaauac cggccgagag aacauagagg uagagauaga cguuaguugu	2580
15	auaauaangu auuuuuuu	2599

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ácido ribonucleico de horquilla (hpARN) con una estructura de tallo y lazo que es capaz de inhibir la expresión de un gen objetivo endógeno en una célula de un insecto coleóptero tras la ingestión, en donde el polinucleótido está operativamente unido a un promotor heterólogo, y en donde el polinucleótido comprende:
 - 5 una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polirribonucleótido de la molécula de hpARN, en donde la primera secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:84, el complemento de al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:84, al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:86, el complemento de al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:86, al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:88, el complemento de al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:88, al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:93 y el complemento de al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:93;
 - 15 una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polirribonucleótido de la molécula de hpARN; y
 - una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un polirribonucleótido de la molécula de hpARN, en donde la tercera secuencia de nucleótidos es sustancialmente el complemento inverso de la primera secuencia de nucleótidos, de manera que los polirribonucleótidos codificados por la primera y la tercera secuencias de nucleótidos se hibridan en una estructura de tallo de la molécula de hpARN,
 - 20 en donde una estructura de lazo de la molécula de hpARN comprende el polirribonucleótido codificado por la segunda secuencia de nucleótidos.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la primera secuencia de nucleótidos es SEQ ID NO:90 o el complemento de SEQ ID NO: 90.
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el promotor heterólogo es funcional en una célula vegetal.
4. Una molécula de ácido ribonucleico de horquilla (hpARN) codificada por el polinucleótido de la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que es capaz de inhibir la expresión de un gen objetivo endógeno en una célula de un insecto coleóptero tras la ingestión, la molécula de hpARN comprende:
 - 30 el primer polirribonucleótido codificado por la primera secuencia de nucleótidos;
 - el segundo polirribonucleótido codificado por la segunda secuencia de nucleótidos; y
 - el tercer polirribonucleótido codificado por la tercera secuencia de nucleótidos,
 - 35 en donde el primer y tercer polirribonucleótidos se hibridan en una estructura de tallo de la molécula de hpARN.
5. Una célula transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la célula es una célula procariota o una célula eucariota.
6. Una célula vegetal transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3.
7. La célula vegetal transgénica de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la célula comprende además un polinucleótido que codifica un polipéptido insecticida a partir de *Bacillus thuringiensis* seleccionado del grupo que consiste en Cry1B, Cry1I, Cry2A, Cry3, Cry7A, Cry8, Cry9D, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43, Cry55, Cyt1A y Cyt2C.
8. Una planta transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3.
9. La planta transgénica de la reivindicación 8, en donde la planta comprende además un polinucleótido que codifica un polipéptido insecticida a partir de *Bacillus thuringiensis* seleccionado del grupo que consiste en Cry1B, Cry1I, Cry2A, Cry3, Cry7A, Cry8, Cry9D, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43, Cry55, Cyt1A y Cyt2C.
10. Una semilla de planta transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3.
11. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, que comprende además un polinucleótido que codifica un polipéptido insecticida a partir de *Bacillus thuringiensis* seleccionado del grupo que consiste en Cry1B, Cry1I, Cry2A, Cry3, Cry7A, Cry8, Cry9D, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43, Cry55, Cyt1A y Cyt2C.
12. Un método para controlar una población de insectos coleópteros, el método comprende alimentar insectos de la población con un agente que comprende la molécula de hpARN de la reivindicación 4.
13. El método de la reivindicación 12, en donde el agente es un cebo de ARN que comprende la molécula de hpARN, o un producto de pulverización que comprende la molécula de hpARN.

14. El método de la reivindicación 12, en donde el agente comprende una célula vegetal transgénica que expresa la molécula de hpARN a partir de un polinucleótido en la célula vegetal.
- 5 15. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el agente es una planta transgénica o material vegetal transgénico que expresa la molécula de hpARN a partir de un polinucleótido en la planta o material vegetal.
- 10 16. Un método para producir una célula vegetal transgénica, el método comprende:
transformar una célula vegetal con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, en donde la molécula es un vector de transformación vegetal;
cultivar la célula vegetal transformada bajo condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo celular vegetal que comprende una pluralidad de células vegetales transformadas;
seleccionar células vegetales transformadas que han integrado el polinucleótido en sus genomas;
tamizar las células vegetales transformadas para la expresión de la molécula de hpARN codificada por el polinucleótido; y
15 seleccionar una célula vegetal que expresa la molécula de hpARN.
- 20 17. Un método para producir una planta transgénica resistente a plagas de coleópteros, el método comprende:
regenerar una planta transgénica a partir de la célula vegetal transgénica de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde la expresión de la molécula de ARN codificada por el polinucleótido es suficiente para reducir la expresión de un gen objetivo en una plaga de coleópteros que ingiere una célula de la planta transgénica.
- 25 18. El método de la reivindicación 16, en donde la célula vegetal transformada comprende además un polinucleótido insecticida que codifica un polipéptido a partir de *Bacillus thuringiensis* seleccionado del grupo que consiste en Cry1B, Cry1I, Cry2A, Cry3, Cry7A, Cry8, Cry9D, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43, Cry55, Cyt1A y Cyt2C.
19. El método de la reivindicación 12, en donde el método comprende además alimentar los insectos de la población con un polipéptido insecticida a partir de *Bacillus thuringiensis*.

Figura 1. Generación de ARNs a partir de un solo molde de transcripción con un solo par de cebadores

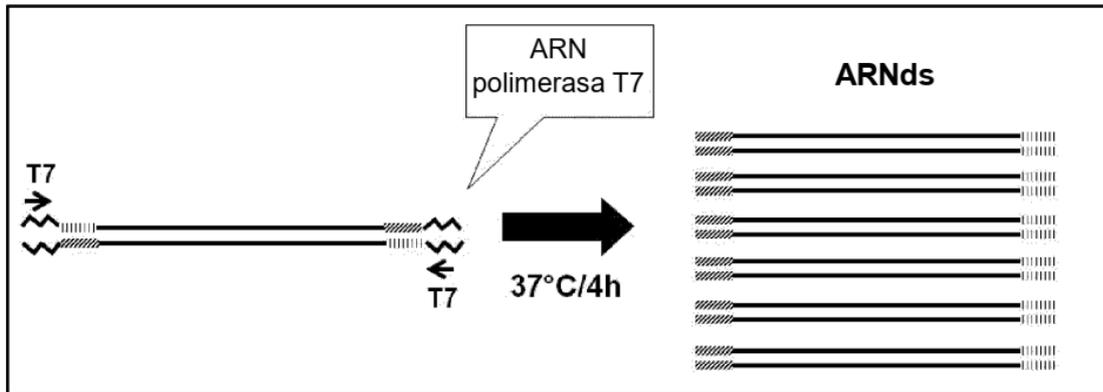


Figura 2. Generación de ARNs a partir de dos moldes de transcripción.

