

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 529**

51 Int. Cl.:
C12N 15/113 (2010.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04818796 .7**
96 Fecha de presentación: **17.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1687435**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2006**

54 Título: **RESISTENCIA A INSECTOS USANDO INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.**

30 Prioridad:
17.11.2003 US 520306 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.02.2012

73 Titular/es:
**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH ORGANISATION
LIMESTONE AVENUE
CAMPBELL, ACT 2601, AU y
BAYER BIOSCIENCE N.V.**

72 Inventor/es:
**WATERHOUSE, Peter Michael;
WHYARD, Steven y
VAN RIE, Jeroen**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 374 529 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

Resistencia a insectos usando inhibición de la expresión génica

Introducción

- 5 Actualmente existen varios enfoques para obtener plantas con mayor resistencia a plagas de insectos de plantas. Sin embargo, para insectos chupadores de savia de las plantas, tales como áfidos, saltadores de plantas, pentatomoideas, y moscas blancas, actualmente sólo hay opciones limitadas para proteger plantas usando enfoques transgénicos. No se ha demostrado que las plantas que expresan las toxinas de *Bacillus thuringiensis* dirigidas a insectos lepidópteros poseen mayor resistencia frente a insectos chupadores de savia de las plantas (Rao et al., 1998).
- 10 La tecnología de dsRNA ha demostrado ser muy específica y muy efectiva silenciando genes endógenos en varios organismos. Sin embargo, el dsRNA proporcionado hasta la fecha está empaquetado típicamente en una célula bacteriana o de levadura, o en agentes que promueven la transfección, tales como liposomas. En esta invención, ahora se ha demostrado que el dsRNA desnudo, sin empaquetar, se puede usar para silenciar genes e insectos chupadores de savia de las plantas.
- 15 Los insectos chupadores de savia de las plantas se alimentan típicamente de la savia en el sistema vascular de las plantas, con la que entran en contacto con los estiletes de su probóscide, provocando una reducción en la vitalidad de la planta y la diseminación de varias enfermedades víricas de la planta. Los insectos chupadores de savia de las plantas tienen típicamente un ciclo corto de vida, y son capaces de construir muy rápidamente inmensas poblaciones en una planta hospedante.
- 20 Antecedentes de la invención
- La Solicitud PCT publicada WO 00/01846 se refiere generalmente a un método para aliviar la infestación de plagas de plantas, método el cual comprende a) identificar una secuencia de ADN de dicha plaga que es crítica para su supervivencia, crecimiento, proliferación o reproducción, b) clonar dicha secuencia o un fragmento de la misma en un vector adecuado con relación a uno o más promotores capaces de transcribir dicha secuencia en ARN o dsRNA al unir un factor de transcripción apropiado a dichos promotores, y c) introducir dicho vector en la planta. Las plagas de las plantas citadas en esta solicitud PCT publicada son nematodos.
- 25 La patente US 6.326.193 se refiere al uso de virus recombinantes de insectos, tales como baculovirus que expresan dsRNA, para silenciar genes seleccionados de insectos.
- 30 La Solicitud PCT publicada WO 99/32619 describe generalmente que se puede usar dsRNA para reducir la destrucción de cosechas por otros patógenos de plantas tales como arácnidos, insectos, nematodos, protozoos, bacterias, u hongos. Esta solicitud muestra que la bacteria de *E. coli* que expresa dsRNAs puede conferir efectos inhibidores específicos en larvas de nematodo *C. elegans* que se alimentan en estas bacterias.
- 35 Timmons et al. (2001) describe que la ingestión de bacterias que expresan dsRNAs pueden producir interferencia genética en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Estos autores describen que, desde una perspectiva de la bioingeniería, puede ser posible usar dsRNA comestible manipulado mediante bioingeniería para modificar la expresión génica en cualquier organismo que tenga una respuesta a dsRNA específica de genes similar a la de *C. elegans*. Para responder a tal intervención, el organismo diana necesitaría tener tanto un mecanismo de respuesta a dsRNA (RNAi) como un mecanismo de captación/diseminación de dsRNA que produjese respuestas tales como las observadas en *C. elegans*.
- 40 De forma similar, también se dio a conocer la inhibición de la expresión génica tras la ingestión de bacterias que expresan ARN bicatenario para platelmintos planarios de agua fresca (Newmark et al., 2003).
- La Solicitud de Patente PCT publicada WO 2004/005485 describe el uso de vectores que comprenden secuencias diseñadas para controlar nematodos parásitos de plantas mediante interferencia de ARN, y plantas transgénicas transformadas con tales vectores.
- 45 La Solicitud de Patente US publicada 20030180945 describe generalmente genes quiméricos capaces de producir ARN antisentido o sentido equipado con un promotor procariota adecuado para la expresión del ARN antisentido o sentido en un hospedante procariota particular. El hospedante procariota se puede usar como una fuente de ARN antisentido y/o sentido, por ejemplo alimentándolo a un animal, tal como un nematodo o un insecto, en el que se prevé el silenciamiento de un gen diana y se monitoriza mediante reducción de la expresión del gen informador. El gen diana y los genes informadores deberían ser genes presentes en las células del organismo eucariota diana, y no en el organismo hospedante procariota.
- 50 La Solicitud de Patente US publicada 20030154508 describe un método para el control de plagas que comprende exponer dicha plaga a un compuesto que destruye, en dicha plaga, un transportador de aminoácido

catiónico/proteína de canal. Generalmente se describen células vegetales modificadas genéticamente para producir al menos un RNAi bicatenario que se diseña para ser ingerido por las plagas durante la alimentación para bloquear la expresión (o la función) de un gen diana. Se describe que se puede usar RNAi para reducir o prevenir la traducción de mensajes en cualquier tejido de la plaga debido a su capacidad para cruzar fronteras celulares y tisulares. Se describe además que RNAi, que se pone en contacto con una plaga mediante empapamiento, inyección o consumo de una fuente alimentaria, cruzará las fronteras tisulares y celulares, y que RNAi también se puede usar como un factor epigenético para prevenir la proliferación de generaciones subsiguientes de plagas.

La Solicitud de Patente PCT publicada WO 01/37654 describe generalmente dsRNA dirigido contra insectos perforadores/chupadores e insectos masticadores, y que los RNAs bicatenarios destinados a conferir resistencia a insectos chupadores de savia se expresarían preferentemente en tejidos vegetales en los que se alimentan tales insectos, por ejemplo elementos del floema primario y secundario, y serían ingeridos por el insecto vía su mecanismo chupador, por ejemplo su estilete. El único insecto para el que se ejemplifica la aplicación de dsRNA es *Manduca sexta*, un insecto lepidóptero. La susceptibilidad de este insecto a RNAi se determinó tratando larvas con dsRNA mediante alimentación o mediante inyección directa. Los resultados de estos experimentos muestran que, con secuencias de dsRNA derivadas de tres genes separados, la inyección en *M. sexta* conduce a una disminución sustancial de la expresión del gen endógeno. No se dan resultados del experimento de alimentación.

La Solicitud de Patente PCT publicada WO 02/14472 describe métodos para inhibir la expresión de un gen diana, expresando en una célula un constructo de ácido nucleico que comprende una repetición invertida y una región sentido o antisentido que tiene identidad de secuencia sustancial con un gen diana, en los que la repetición invertida no está relacionada con el gen diana. Como una de las posibles dianas, se enumeran insectos tales como insectos chupadores.

La Solicitud de Patente publicada US 20030150017 describe el uso de moléculas de ARN homólogas o complementarias a una secuencia nucleotídica de una plaga de plantas tal como nematodos e insectos. En los Ejemplos se sugiere la aplicación de RNAi a una especie de insecto modelo, el insecto lepidóptero *Helicoverpa armigera*, en el modelo de planta de lechuga, pero no se realiza ningún experimento de alimentación ni se dan los resultados.

La Solicitud de Patente PCT publicada WO 03/004644 A1 describe que la distancia evolutiva entre nematodos e insectos es considerable, y que no hay ninguna razón para suponer que mientras que la alimentación de dsRNA a *C. elegans* fue exitosa, sería una técnica fácilmente transferible a insectos. Describe además el uso de tecnología de dsRNA para artrópodos, y muestra que la alimentación directa de dsRNA desnudo, sin empaquetar, fracasó a la hora de producir un fenotipo de RNAi en *Drosophila melanogaster* y *Helicoverpa armigera*, indicando que fueron necesarios agentes que promueven la transfección, tales como liposomas, indicando que fueron necesarios agentes promotores de la transfección, tales como liposomas, para la transfección efectiva en estas especies. Esta solicitud prevé generalmente que, en artrópodos con un sistema digestivo simple, dsRNA desnudo puede ser efectivo obteniendo el silenciamiento génico. En esta solicitud no se incluyen resultados del suministro de dsRNA desnudo a ningún artrópodo.

Gura (2003) describe que mientras que en la alimentación de *C. elegans* de cepas de *E. coli* manipuladas mediante ingeniería para producir el ARN bicatenario puede activar RNAi, la alimentación en el insecto *Drosophila* de células de levadura manipuladas para obtener ARN bicatenario no funcionó.

También, Rajagopal et al. (2002) describieron que, en insectos *Spodoptera litura*, los experimentos para introducir dsRNA en larvas neonatas de *S. litura* empapándolas en disolución de dsRNA o alimentándolas a través de la dieta no tuvieron éxito, puesto que no se detectó ninguna reducción en los niveles del transcrito.

Rao et al. (1998) describen que la expresión de una lectina de galanto en plantas de arroz transgénicas puede ofrecer resistencia al saltador marrón del arroz.

Por tanto, la técnica anterior no muestra que dsRNA o siRNA desnudo, sin empaquetar, se puede usar para obtener el silenciamiento génico en insectos a través de la alimentación.

Sumario

Según esta invención, se proporciona un método para silenciar un gen de un insecto chupador de savia de las plantas, que comprende aplicar a la dieta o al alimento de dicho insecto chupador de savia de las plantas dsRNA o siRNA sin agentes promotores de la transfección, dsRNA o siRNA el cual es dirigido a un gen esencial del insecto chupador de savia de las plantas.

También se proporciona aquí un método para identificar la función de un gen en un insecto chupador de savia de las plantas, que comprende la etapa de aplicar dsRNA o siRNA, dirigido a un gen de un insecto chupador de savia de las plantas, a la dieta de dicho insecto, y evaluar los cambios fenotípicos o bioquímicos en dicho insecto, en el que

dicho dsRNA o siRNA se aplica sin agentes promotores de la transfección.

5 Según esta invención, también se proporciona aquí un método para obtener una mortalidad significativa de los insectos o un control significativo de los insectos silenciando un gen esencial de un insecto chupador de savia de las plantas mediante aplicación de dsRNA o siRNA al alimento de dicho insecto, en comparación con insectos de control alimentados en dsRNA o siRNA dirigido a un gen no esencial o un gen no expresado en el insecto chupador de savia de las plantas.

10 En una realización de esta invención, se proporciona cualquiera de los métodos anteriores, en el que dicho gen del insecto chupador de savia es homólogo a un gen el cual, cuando se silencia parcial o completamente en un insecto tal como *Drosophila*, da como resultado un mutante con un fenotipo letal, y en el que 2 genes son homólogos cuando son similares en secuencia hasta un grado tal que, cuando se alinean las dos secuencias, el número de posiciones con nucleótidos idénticos, dividido entre el número de nucleótidos en la más corta de las secuencias, es mayor que 70%.

15 En otra realización de esta invención, se proporciona cualquiera de los métodos anteriores, en el que dicho gen del insecto chupador de savia es un gen cuyo silenciamiento provoca una disminución del crecimiento, desarrollo, reproducción o supervivencia de un insecto chupador de savia de las plantas, en comparación con insectos de control alimentados en dsRNA o siRNA dirigido a un gen no expresado en el insecto chupador de savia de las plantas.

20 En una realización adicional, se proporciona cualquiera de los métodos anteriores, en el que dicho dsRNA o siRNA no silencia genes de una planta, ni de animales no dianas, tales como depredadores de insectos chupadores de savia de las plantas, o animales tales como reptiles, anfibios, pájaros, o mamíferos.

25 Se proporciona además aquí cualquiera de los métodos anteriores, en el que se selecciona una porción de una secuencia diana que está presente en varios insectos chupadores de savia de las plantas de un hospedante vegetal en idéntica secuencia o con identidad elevada de secuencia, en el que una secuencia con una identidad elevada de secuencia se refiere al número de posiciones con idénticos nucleótidos dividido entre el número de nucleótidos en la más corta de las secuencias, siendo mayor que 95%.

También se proporciona aquí cualquiera de los métodos anteriores, en el que dicho gen del insecto chupador de savia se selecciona del grupo que consiste en: el factor 1A de iniciación de la transcripción eucariota (eIF1A), un gen de (alfa)tubulina, un gen de alfa-actinina, y un gen del receptor de ecdisona.

30 Se proporciona además aquí cualquiera de los métodos anteriores, en el que dichos genes del insecto chupador de savia de las plantas son aquellos genes del insecto chupador de savia de las plantas identificados usando los cebadores de una cualquiera de SEC ID NO:1-4 y SEC ID NO:9 y 10, o los genes de insecto chupador de savia de las plantas que corresponden a o que comprenden una cualquiera de las secuencias de SEC ID NO:5 a 8, SEC ID NO:11 o SEC ID NO:12, así como genes de ácidos homólogos a las secuencias de SEC ID NO:5 a 8, SEC ID NO:11 o SEC ID NO:12, en el que 2 genes son homólogos cuando son similares en secuencia en un grado tal que, cuando se alinean las dos secuencias, el número de posiciones con nucleótidos idénticos, dividido entre el número de nucleótidos en la más corta de las secuencias, es mayor que 70%, así como tales métodos en los que dsRNA o siRNA busca como diana la secuencia de SEC ID NO: 5 de eIF1A de *A. gossypii* sólo en la porción desde la posición nucleotídica 72 hasta el final en SEC ID NO:5.

35 También se proporciona aquí cualquiera de los métodos anteriores, en el que dicho gen de insecto chupador de savia de las plantas comprende la secuencia de una cualquiera de SEC ID NO:5 a 8, o SEC ID NO:12. Se proporciona además aquí un método para identificar nuevas dianas para compuestos insecticidas, que comprende la etapa de: a) aplicar dsRNA o siRNA sin agentes promotores de la transfección al alimento o dieta de un insecto chupador de savia de las plantas; b) analizar qué genes, cuando se silencian, confieren letalidad a dicho insecto, c) clonar y caracterizar dichos genes así analizados; d) identificar compuestos que destruyen o inactivan a dicho gen o al ARN o proteína codificada de ese modo; y e) poner en contacto dichos compuestos con dicho insecto o con la alimentación o dieta de dicho insecto, para confirmar la naturaleza plaguicida de dicho compuesto.

Descripción detallada de la invención

40 Según la invención, se alimenta dsRNA o siRNA a un insecto chupador de savia de las plantas sin estar contenido en una célula o un agente promotor de la transfección. En una realización de la invención, esta alimentación es sobre una planta que expresa el dsRNA o siRNA, de manera que entra en la savia contenida en su sistema vascular. Un "agente promotor de la transcripción", como se usa aquí, se refiere a un material que contiene lípidos que permite o potencia el paso de la membrana celular, y por tanto asegura la captación por una célula de una molécula extracelular o compuesto tal como un dsRNA, particularmente liposomas. Tales agentes se describen en la solicitud de patente PCT publicada WO 03/004644. Para evitar dudas, los oligopéptidos catiónicos usados en algunas realizaciones de la actual invención no están incluidos en esta definición de agentes promotores de la transfección.

55 Un dsRNA o siRNA suministrado sin agente promotor de la transcripción también se denomina aquí como dsRNA o

siRNA “desnudo” y/o “no empaquetado”. Un oligopéptido catiónico, como se usa aquí, no “empaqueta” dsRNA o siRNA (contrariamente a un agente promotor de la transfección, tal como un liposoma), y por tanto se puede suministrar junto con el dsRNA o siRNA en el caso del suministro “no empaquetado” de dsRNA o siRNA. El término “quimérico”, cuando se refiere a un gen o secuencia de ADN, se usa para referirse a un gen o secuencia de ADN que comprende al menos dos fragmentos de ADN funcionalmente relevantes (tal como promotor, 5'UTR, región codificante, 3'UTR, intrón) que no están naturalmente asociados entre sí y/o se originan, por ejemplo, de diferentes fuentes. “Extraño”, referido a un gen o secuencia de ADN con respecto a una especie vegetal, se usa para indicar que el gen o secuencia de ADN no se encuentra naturalmente en esta planta, o no se encuentra naturalmente en ese locus genético en esa planta. La expresión “ADN extraño” se usará aquí para referirse a una secuencia de ADN tal como se ha incorporado en el genoma de una planta como resultado de la transformación.

Dos secuencias o genes (o sus partes) que son “homólogos” o “similares”, como se usa aquí, son similares en secuencia hasta un grado tal que, cuando las dos secuencias se alinean, el porcentaje de identidad de secuencia, es decir, el número de posiciones con nucleótidos idénticos dividido entre el número de nucleótidos en la más corta de las secuencias, es mayor que 70%, mayor que 85%, mayor que 90%, mayor que 95%, o está entre 96% y 100%. Los genes homólogos o sus partes, como se usa aquí, no requieren ninguna relación evolutiva, aunque los genes relacionados entre sí mediante evolución independiente desde el mismo gen ancestral pueden ser genes homólogos como se usa aquí. Como se usa aquí, un gen “homólogo” (o gen homólogo) puede ser un parálogo génico (o un gen parálogo) y un ortólogo génico (o un gen ortólogo). En una realización de la invención, un gen homólogo es un gen ortólogo (es decir, un gen similar en una especie diferente evolucionado probablemente desde un ancestro común y que normalmente ha retenido esencialmente el mismo o la misma función). Secuencias o partes de secuencias que dan “elevada identidad de secuencia”, como se usa aquí, se refiere a número de posiciones con nucleótidos idénticos dividido entre el número de nucleótidos en la más corta de las secuencias, siendo mayor que 95%, o entre 96% y 100%. Un gen diana, o al menos una parte del mismo, como se usa aquí, tiene preferiblemente una elevada identidad de secuencia con el dsRNA de la invención a fin de que tenga lugar el silenciamiento génico eficiente en la plaga diana. La identidad en la secuencia del dsRNA o siRNA con una parte del ARN del gen diana está incluida en la actual invención, pero no es necesario.

Para los fines de esta invención, la “identidad de secuencia” de dos secuencias nucleotídicas o de aminoácidos relacionadas, expresado como porcentaje, se refiere al número de posiciones en las dos secuencias óptimamente alineadas que tienen restos idénticos ($\times 100$), dividido entre el número de posiciones comparadas. Un salto, es decir, una posición en un alineamiento en la que un resto está presente en una secuencia pero no en la otra, se considera como una posición con restos no idénticos. El alineamiento de las dos secuencias se lleva a cabo mediante el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch 1970). Se puede llevar a cabo convenientemente un alineamiento de secuencias asistido por ordenador usando un programa de software estándar tal como GAP, que es parte del Wisconsin Package Version 10.1 (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA), usando la matriz de puntuación por defecto con una penalización de creación de saldo de 50 y una penalización de extensión de salto de 3.

Para los fines de la invención, el “complemento de una secuencia nucleotídica X” es la secuencia nucleotídica que sería capaz de formar una molécula de ADN bicatenario con la secuencia nucleotídica representada, y que podría derivar de la secuencia nucleotídica representada sustituyendo los nucleótidos por su nucleótido complementario según las reglas de Chargaff ($A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$) y leyendo en la dirección de 5' a 3', es decir, en dirección opuesta de la secuencia nucleotídica representada.

Como se usa aquí, “dsRNA” se refiere a un ARN bicatenario que comprende una porción sentido y una porción antisentido de un gen diana seleccionado (o secuencias con elevada identidad de secuencia con él, de forma que se puede producir el silenciamiento génico), así como cualesquiera RNAs bicatenarios más pequeños formados a partir de él mediante ARNasa o actividad dicer. Tal dsRNA puede incluir porciones de ARN monocatenario, pero contiene ARN bicatenario con al menos 19 nucleótidos. En una realización de la invención, el dsRNA es un ARN de orquilla que contiene una secuencia bucle o espaciadora entre las secuencias sentido y antisentido del gen seleccionado como diana, preferiblemente tal región espaciadora del ARN de horquilla contiene un intrón, particularmente un intrón del gen *rolA* (Pandolfini et al., 2003), los intrones de orientación dual de pHellsgate 11 ó 12 (véase el documento WO 02/059294, y SEC ID NO: 25 y 15 allí) o el intrón *pdK* (intrón 2 de piruvato ortofosfato dicianasa de *Flaveria trinervia*; véase el documento WO 99/53050). “siRNAs”, como se usa aquí, son moléculas de ARN (bicatenario) de interferencia pequeño de 16-30 pb, 19-28 pb, o 21-26 pb, por ejemplo las formas de ARN que se pueden crear mediante ARNasa III o actividad dicer a partir de un dsRNA más largo. “siRNAs”, como se usa aquí, incluye cualquier ARN bicatenario de 19 a 26, ó 21 a 24 pares de bases, que puede interferir con la expresión génica cuando está presente en una célula en la que se expresa tal gen. siRNA se puede obtener sintéticamente, se puede expresar y se puede segregar directamente de una célula transformada, o se puede generar a partir de un dsRNA más largo mediante actividad enzimática. Estos siRNAs pueden tener extremos romos, o pueden tener extremos que solapan.

En una realización de la invención, los RNAs sentido y antisentido se pueden expresar separadamente in vitro o en células hospedantes, por ejemplo en células de una planta procedentes de constructos génicos quiméricos

diferentes usando el mismo promotor o uno diferente, o a partir de un constructo que contiene dos promotores convergentes en orientación opuesta. Estos RNAs sentido y antisentido, que se forman, por ejemplo, en las mismas células vegetales, se pueden combinar entonces para formar dsRNA o siRNA. Está claro que siempre que se haga referencia aquí a un gen quimérico dsRNA o siRNA o una molécula de dsRNA o siRNA, tal dsRNA o siRNA formado, por ejemplo en células vegetales, a partir de ARN sentido y antisentido producidos separadamente también está incluido. También están incluidos aquí siRNA o dsRNA obtenido sintéticamente que se hibrida a hebras de ARN, cuando las hebras sentido y antisentido están presentes juntas.

Un dsRNA o siRNA “dirigido a un gen de insecto chupador de savia de las plantas, como se usa aquí, se refiere a un dsRNA o siRNA que se diseña para ser idéntico o tener una elevada identidad de secuencia con un gen de insecto chupador de savia de las plantas endógeno (un gen diana), y como tal se diseña para silenciar tal gen al aplicarlo a tal insecto. Un dsRNA puede seleccionar como diana uno o varios genes homólogos en un insecto chupador de savia de las plantas, o uno o varios genes homólogos en diferentes insectos chupadores de savia de las plantas, que se pueden alimentar en la misma planta hospedante.

El gen quimérico de dsRNA, que codifica un dsRNA dirigido a un gen esencial de un insecto chupador de savia de las plantas, se puede insertar de forma estable de manera convencional en el genoma de una única célula vegetal, y la célula vegetal así transformada se puede usar de manera convencional para producir una planta transformada que tiene una mayor resistencia a insectos. A este respecto, se puede usar un plásmido Ti desarmado, que contiene el gen quimérico de dsRNA, en *Agrobacterium tumefaciens* para transformar la célula vegetal, y después se puede regenerar una planta transformada a partir de la célula vegetal transformada usando los procedimientos descritos en la técnica, por ejemplo en los documentos EP 0 116 718, EP 0 270 822, publicación PCT WO 84/02913 y Solicitud de Patente Europea publicada (“EP”) 0 242 246. Los vectores preferidos del plásmido Ti contienen cada uno el gen quimérico de dsRNA entre las secuencias frontera, o al menos localizado a la izquierda de la secuencia frontera derecha, del T-DNA del plásmido Ti. Por supuesto, se pueden usar otros tipos de vectores para transformar la célula vegetal, usando procedimientos tales como transferencia génica directa (como se describe, por ejemplo, en el documento EP 0233247), transformación mediada por polen (como se describe, por ejemplo, en el documento EP 0270356, en la publicación PCT WO 85/01856, y en la patente US 4.684.611), la transformación mediada por un virus de ARN vegetal (como se describe, por ejemplo, en el documento EP 0067553 y en la patente US 4.407.956), la transformación mediada por liposomas (como se describe, por ejemplo, en la patente US 4.536.475), y otros métodos tales como los métodos para transformar ciertas estirpes de maíz (por ejemplo, patente US 6.140.553; Fromm et al., 1990; Gordon-Kamm et al., 1990) y arroz (Shimamoto et al., 1989; Datta et al., 1990), y el método para transformar monocotiledóneas de forma general (publicación PCT WO 92/09696). Para la transformación de algodón, se prefiere especialmente el método descrito en la publicación de patente PCT WO 00/71733. Para la transformación de haba de soja, se hace referencia a los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo Hinchee et al. (1988) y Christou et al. (1990), o el método del documento WO 00/42207.

La planta transformada resultante se puede usar en un esquema de reproducción vegetal convencional para producir más plantas transformadas con las mismas características, o para introducir el gen de dsRNA en otras variedades de la misma especie vegetal o una especie vegetal relacionada. Las semillas, que se obtienen de las plantas transformadas, contienen el gen de dsRNA como un inserto genómico estable. Las plantas que comprenden un dsRNA o siRNA según la invención incluyen plantas que comprenden o derivan de portainjertos de plantas que comprenden el gen quimérico de dsRNA de la invención, por ejemplo árboles frutales. Por tanto, cualesquiera partes vegetales injertadas no transgénicas, insertadas en una planta o parte de una planta transformada, están incluidas en la invención, puesto que la señal de interferencia de ARN es transportada a estas partes injertadas, y cualesquiera áfidos que se alimenten en tal planta injertada se verá afectado de forma similar por el dsRNA o el siRNA de la invención.

Un ADN que codifica un dsRNA se inserta en un genoma de una célula vegetal de forma que este ADN está en dirección 3' (es decir, 3') de, y enlazado operablemente a, un promotor expresable en la planta, que puede dirigir la expresión en células vegetales. Esto se logra preferiblemente insertando el gen quimérico de dsRNA en el genoma de la célula vegetal, particularmente en el genoma nuclear o de plastidios (por ejemplo, cloroplasto).

Un “promotor expresable en una planta”, como se usa aquí, se refiere a un promotor que asegura la expresión de un dsRNA de la invención en una célula vegetal. Los ejemplos de promotores que dirigen la expresión constitutiva en plantas son conocidos en la técnica, e incluyen: los promotores 35S constitutivos fuertes (los “promotores 35S”) del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), por ejemplo de aislados CM 1841 (Gardner et al., 1981), CabbB-S (Franck et al., 1980) y CabbB-JI (Hull y Howell, 1987); promotores de la familia de ubiquitina (por ejemplo, el promotor de ubiquitina de maíz de Christensen et al., 1992, véase también Comejo et al., 1993), el promotor *gos2* (de Pater et al., 1992), el promotor *emu* (Last et al., 1990), promotores de actina tales como el promotor descrito por An et al. (1996), el promotor de actina de arroz descrito por Zhang et al. (1991); promotores del virus del mosaico de la vena de Cassava (documento WO 97/48819, Verdaguer et al. (1998)), la serie pPLEX de promotores del virus de la atrofia del trébol subterráneo (documento WO 96/06932, particularmente el promotor S4 o S7), un promotor de alcohol deshidrogenasa, por ejemplo pAdh1S (números de acceso de GenBank X04049, X00581), y el promotor TR1' y el promotor TR2' (el “promotor TR1'” y el “promotor TR2'”, respectivamente) que conduce la expresión de los genes 1' y

2' genes, respectivamente, del T-DNA (Velten et al., 1984). Como alternativa, un promotor expresable en una planta puede ser un promotor específico de tejidos, es decir, un promotor que dirige un mayor nivel de expresión en algunas células o tejidos de la planta, por ejemplo en tejidos verdes (tal como el promotor de la PEP carboxilasa). Se ha descrito que el promotor vegetal de la PEP carboxilasa (Pathirana et al., 1997) es un promotor fuerte para la expresión en tejido vascular, y es útil en una realización de la actual invención. Como alternativa, un promotor expresable en una planta también puede ser un promotor inducible por lesiones, tal como el promotor del gen de invertasa de la pared celular del guisante (Zhang et al., 1996). Un promotor "inducible por lesiones", como se usa aquí, significa que, al lesionar la planta, ya sea mecánicamente o por la alimentación del insecto, típicamente perforando la planta para acceder al sistema vascular en los insectos chupadores de savia de las plantas, la expresión de la secuencia codificante bajo el control del promotor se incrementa significativamente en tal planta. Se ha demostrado que los insectos chupadores de savia de las plantas también pueden provocar respuestas de defensa por parte de las plantas, similares a las observadas para otros patógenos y lesiones (Moran y Thompson, 2001). Según la actual invención, también se pueden usar promotores de algunos de tales genes inducidos por insectos chupadores de savia de las plantas, preferiblemente cuando su expresión es preferentemente en el tejido vascular, particularmente floema.

En una realización de esta invención, el promotor expresado en plantas es un promotor específico vascular, tal como un promotor específico de floema. Un promotor "específico vascular", como se usa aquí, es un promotor que se expresa al menos en células vasculares, o un promotor que se expresa preferentemente en células vasculares. La expresión de un promotor específico vascular no necesita ser exclusivamente en células vasculares, siendo posible la expresión en otros tipos celulares o tejidos. Un "promotor específico de floema", como se usa aquí, es un promotor expresable en plantas que se expresa al menos en células de floema, o un promotor que se expresa preferentemente en células de floema. La expresión de un promotor específico de floema no necesita ser exclusivamente en células de floema, siendo posible la expresión en otros tipos celulares o tejidos, por ejemplo en tejidos de xilema. En una realización de esta invención, un promotor específico de floema es un promotor expresable en plantas expresado al menos en células de floema, en el que la expresión en células no de floema está más limitada (o ausente) en comparación con la expresión en células de floema. Los ejemplos de promotores específicos vasculares o específicos de floema adecuados según esta invención incluyen, pero no se limitan a, los promotores seleccionados del grupo que consiste en: los promotores SCSV3, SCSV4, SCSV5, y SCSV7 (Schünmann et al., 2003), el promotor del gen rolC de *Agrobacterium rhizogenes* (Kiyokawa et al., 1994; Pandolfini et al., 2003; Graham et al., 1997; Guivarc'h et al., 1996; Almon et al., 1997), el promotor del gen rolA de *Agrobacterium rhizogenes* (Dehio et al., 1993), el promotor del gen 5 de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* (Korber et al. 1991), el promotor del gen RSs1 de sacarosa sintasa del arroz (Shi et al., 1994), el promotor del CoYMV o del badnavirus del moteado amarillo de Commelina (Medberry et al., 1992; Zhou et al., 1998), el promotor de CFDV o del virus de la descomposición foliar del coco (Rohde et al., 1994; Hehn y Rhode, 1998), el promotor de RTBV o del virus baciliforme del tungro del arroz (Yin y Beachy, 1995; Yin et al., 1997), el gen GS3A de glutamina sintasa del guisante (Edwards et al., 1990; Brears et al., 1991), los promotores invCD111 e invCD141 de los genes de invertasa de la patata (Hedley et al., 2000), el promotor aislado de Arabidopsis, que tiene expresión específica del floema en el tabaco, mostrado por Kertbundit et al (1991), la región promotora de VAHOX1 (Tornero et al., 1996), el promotor del gen de invertasa de la pared celular del guisante (Zhang et al., 1996), el promotor de la proteína de algodón endógena relacionada con quitinasa de la solicitud de patente publicada US 20030106097, un promotor del gen de invertasa ácida de la zanahoria (Ramloch-Lorenz et al., 1993), el promotor del gen transportador de sulfato Sultr1;3 (Yoshimoto et al., 2003), un promotor de un gen de sacarosa sintasa (Nolte y Koch, 1993), y el promotor de un gen transportador de sacarosa del tabaco (Kuhn et al., 1997). También, se puede usar cualquier promotor homólogo a (o que tenga una elevada identidad de secuencia con) cualquiera de los promotores anteriores y que también muestre expresión específica del floema. La selección de un promotor particular puede depender de la especie del insecto seleccionado principalmente como diana (por ejemplo, un insecto específico seleccionado como diana puede ser mayoritariamente un alimentador de hojas o mayoritariamente un alimentador de raíces, permitiendo usar especificidades de promotores diferentes), y del nivel de expresión y distribución tisular deseados. Estos promotores se pueden combinar con elementos potenciadores, se pueden combinar con elementos promotores mínimos, o pueden comprender elementos repetidos para asegurar el perfil de expresión deseado.

Los elementos que se pueden usar para incrementar la expresión en células vegetales pueden ser: intrones en el extremo 5' o en el extremo 3' del gen quimérico, por ejemplo el intrón hsp70, elementos potenciadores de promotores, regiones promotoras duplicadas o triplicadas, secuencias líder de 5' diferentes de otro transgén o diferentes de una secuencia líder de un gen endógeno (hospedante vegetal), secuencias *trailer* de 3' diferentes de otro transgén usado en la misma planta, o diferentes de una secuencia *trailer* endógena (hospedante vegetal).

El gen de dsRNA de la invención se puede insertar en el genoma vegetal de forma que la parte génica insertada está en dirección 5' (es decir, 5') de señales de regulación de la transcripción del extremo 3' adecuadas (es decir, señales de formación del transcrito y poliadenilación). Esto se logra preferiblemente insertando el gen quimérico de dsRNA en el genoma de la célula vegetal. Las señales de poliadenilación y de formación del transcrito preferidas incluyen aquellas del gen de nopalina sintasa (Depicker et al., 1982), el gen de octopina sintasa (Gielen et al., 1984), los terminadores de SCSV o de la enzima (Schunmann et al., 2003), y el gen 7 de T-DNA (Velten y Schell, 1985),

que actúa como secuencias de ADN sin traducir en 3' en células vegetales transformadas.

El gen quimérico de dsRNA se puede insertar opcionalmente en el genoma vegetal como un gen híbrido, que contiene varias regiones de dsRNA que se dirigen a diferentes genes en los mismos insectos chupadores de savia de las plantas o diferentes insectos, o que se dirigen a porciones diferentes del mismo gen. También, es conveniente incluir en el ADN transformante de la invención un gen marcador seleccionable o puntuable, tal como el gen *neo*, de forma que las plantas transformadas se pueden seleccionar fácilmente mediante aplicación de glufosinato o canamicina, respectivamente, como es bien conocido en la técnica.

Aunque el suministro vegetal de un dsRNA o siRNA es una realización de esta invención, según esta invención, la aplicación del dsRNA o siRNA de la invención a un insecto chupador de savia de las plantas se puede realizar de varias maneras, y no necesita ser mediante una planta que expresa un dsRNA o siRNA. Está incluido aquí cualquier método de suministro de siRNA o dsRNA no contenido en una célula o un agente de transfección celular (tal como un liposoma), por ejemplo siRNA o dsRNA producido *in vitro* aplicado a una dieta o alimentación del insecto.

“Actividad insecticida” de un dsRNA o siRNA, como se usa aquí, se refiere a la capacidad para obtener mortalidad en insectos cuando tal ARN se alimenta de insectos, preferiblemente mediante expresión en un hospedante recombinante tal como una planta, mortalidad la cual es significativamente mayor que los controles (usando un dsRNA no de insecto o tampón). “Control de insectos” de un dsRNA o siRNA, como se usa aquí, se refiere a una cantidad de ARN que es suficiente para limitar el daño en una planta por insectos que se alimentan en tal planta, por ejemplo exterminando los insectos o inhibiendo el desarrollo, fertilidad o crecimiento de los insectos de manera tal que proporcionen menos daño a una planta, produzcan una menor descendencia, sean menos adecuados o más susceptibles al ataque de los depredadores, o que los insectos sean incluso disuadidos de alimentarse en tal planta.

La información sobre cómo diseñar secuencias de dsRNA o siRNA óptimas una vez que se conoce un gen diana se puede encontrar con proveedores comerciales, por ejemplo las compañías Ambion y Cenix BioScience (Ambion Inc., 2130 Woodward Street, Austin, TX 78744-1832, USA; y véase www.ambion.com; y Cenix BioScience GmbH, Pfothenhauerstr. 108, 01307 Dresden, Alemania, véase www.cenix-bioscience.com). Preferiblemente, los dsRNAs o siRNAs a usar en esta invención seleccionan como diana al menos un gen esencial de un insecto chupador de savia de las plantas, o un gen esencial de un insecto chupador de savia de las plantas que aparece sin divergencia significativa de secuencia (al menos en una cierta región) en un intervalo de plagas de insectos chupadores de savia de las plantas de la planta hospedante implicada. En una realización de esta invención, tales dsRNAs o siRNAs no silencian genes del hospedante vegetal o de otros animales no dianas, tales como depredadores del insecto chupador de savia de las plantas (por ejemplo, larvas de mariquita, antocóridos, neurópteros, avispas parasitarias o larvas de sírfidos) o animales tales como reptiles, anfibios, pájaros, o mamíferos. Esto se puede analizar en bases de datos disponibles, por ejemplo mediante una búsqueda de BLAST (véase también www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) o mediante hibridación con librerías de ADN existentes de organismos no dianas representativos. A este respecto, cuando se usa la secuencia de SEC ID NO: 5 de eIF1A de *A. gossypii* para transformar una planta con un gen quimérico de dsRNA, preferiblemente sólo se debería usar aquella porción desde la posición nucleotídica 72 hasta el final en SEC ID NO: 5 como diana génica a la hora de diseñar la molécula de dsRNA, o se debería evitar en el dsRNA al menos la porción desde la posición nucleotídica 50 hasta 73 en SEC ID NO: 5. En una realización, se selecciona una porción de una secuencia diana que está presente en varios insectos chupadores de savia de las plantas de una planta hospedante en secuencia idéntica o con elevada identidad de secuencia, por ejemplo una parte de una clase de gen o genes con homología de secuencia elevada en varias plagas de insectos chupadores de savia de las plantas.

Un “gen diana” de insectos chupadores de savia de las plantas, o “un gen esencial”, o “un gen esencial para un insecto chupador de savia de las plantas”, como se usa aquí, es un gen cuyo silenciamiento provoca una disminución del crecimiento, desarrollo, reproducción o supervivencia de un insecto chupador de savia de las plantas. En una realización, el silenciamiento parcial o completo de un gen esencial de un insecto chupador de savia de las plantas da como resultado la mortalidad significativa del insecto o el control significativo del insecto cuando tal gen se silencia mediante dsRNA o siRNA en comparación con insectos de control alimentados en dsRNA o siRNA que seleccionan como diana un gen no esencial o un gen no expresado en el insecto chupador de savia de las plantas. En una realización de esta invención, el dsRNA o siRNA de la invención corresponde a un exón en el gen diana.

En una realización de la invención, se seleccionan como dianas genes expresados en células del tejido intestinal de insectos chupadores de savia de las plantas, o en el intestino medio, preferiblemente genes implicados en el metabolismo, crecimiento o diferenciación de células intestinales. Estos genes pueden codificar proteínas de membrana del intestino de insectos chupadores de savia de las plantas, tales como moléculas transportadoras o bombas de iones, por ejemplo un gen de vATPasa (por ejemplo, un homólogo del gen de *Drosophila* de número de acceso de Genbank AF143200) o un gen transportador de aminoácidos. Los genes diana útiles de insectos chupadores de savia de las plantas según la invención también incluyen genes que codifican lo siguiente: un factor de transcripción; una monooxigenasa amidante en alfa de peptidilglicina (por ejemplo, un homólogo del gen *phm* de *Drosophila* descrito en Jiang et al., 2000); una cisteína proteasa (Cristofolletti et al., 2003), una aminopeptidasa (por

ejemplo, un gen homólogo a un gen de aminopeptidasa N expresado en el intestino de *Drosophila*, o un gen que codifica aminopeptidasa N de áfido de guisante (Rahbé et al., 1995; Cristofolletti et al., 2003), una dipeptidasa, una sacarasa/transglucosidasa (véase, Ashford et al. 2000; Cristofolletti et al. (2003)); un factor de iniciación de la traducción (tal como el factor 1A de iniciación de la traducción eucariota (eIF1A) (por ejemplo, basado en el homólogo en *Drosophila* (Myrick y Dearolf, 2000, número de acceso de Genbank AF169359)), un factor de alargamiento de la traducción (tal como un gen de un insecto chupador de savia de las plantas homólogo al gen del factor 1 alfa de alargamiento de *Drosophila* (Hovemann et al., 1988, número de acceso de Genbank X06869)); un factor de corte y empalme (tal como un homólogo génico del gen de SF1 de *Drosophila* (Marzoui et al., 1999), o número de acceso de Genbank NM_079915); una IAP inhibidora de la apoptosis (por ejemplo, un homólogo del gen de IAP descrito en Hay, 2000 o número de acceso de Genbank AA801628); una (alfa) tubulina (por ejemplo, el homólogo del gen de alfa-tubulina de *Drosophila* descrito en Matthews y Kaufman, 1987 o en el número de acceso de Genbank AI 124284), una actina o alfa-actinina (por ejemplo, el homólogo del gen de *Drosophila* descrito en Fyrberg et al., 1998; Dubreuil y Wang, 2000, y en número de acceso de Genbank NM_058137); una proteína de histona (por ejemplo, un homólogo de la familia H2A.F/Z de genes de histona de *Drosophila* (Clarkson y Saint, 1999), tal como H2AvD (van Daal y Elgin, 1992, Clarkon et al., 1999; número de acceso de Genbank NM_079795); una histona desacetilasa (tal como un homólogo de las histona desacetilasas HDAC1 (Mottus et al., 2000); HDAC3 (Johnson et al, 1998) o HDAC4a (Zeremsky et al., 2003), número de acceso de Genbank AF538713); una proteína del ciclo celular; una proteína esencial para la respiración celular; un receptor para una señal hormonal específica de insectos, un receptor de hormona juvenil (por ejemplo, un gen de receptor de hormona juvenil chupador de savia de las plantas descrito en las solicitudes de patentes PCT publicadas WO 99/36520 y WO 01/02436), un receptor de hormona peptídica de insecto; genes homólogos de insectos chupadores de savia de las plantas de los genes de dmHelicasa, dmPITP o dmSPL de *Drosophila* identificados en el documento WO 01/42479; un (una parte de) receptor de ecdisona (por ejemplo, un gen del receptor de ecdisona de chupadores de savia de las plantas, como los genes de *M. persicae* o *B. tabaci* descritos en las publicaciones de patentes PCT publicadas WO 99/36520 y WO 01/02436; o un gen de insecto homólogo al gen del receptor de ecdisona de *Drosophila* (véase, por ejemplo, las formas del gen del receptor de ecdisona descritas en Bender et al. (1997); Lam y Thummel, 2000), o al gen de ultraspiráculo de *Drosophila* (Henrich et al., 2000)); una proteína esencial para regular el equilibrio iónico en las células (por ejemplo, una bomba de protones, una bomba de Na/K, etc.); una proteasa intestinal; etc. Los genes diana posibles también son otros genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de la sacarosa en el insecto chupador de savia de las plantas, preferiblemente en el intestino, o genes que codifican enzimas digestivas tales como la proteasa similar a tripsina o la proteasa similar a catepsina B, que se describieron recientemente en un insecto homóptero chupador de savia de las plantas, el saltador marrón del arroz (Foissac et al., 2002), y genes homólogos encontrados en otros insectos chupadores de savia de las plantas.

Las secuencias diana preferidas según esta invención son los genes de insectos chupadores de savia de las plantas identificados usando los cebadores de una cualquiera de SEC ID NO:1-4 y SEC ID NO:9 y 10, o genes de insectos chupadores de savia de las plantas que corresponden a o que comprenden una cualquiera de las secuencias de SEC ID NO:5 a 8, SEC ID NO:11 o SEC ID NO:12, así como genes de áfidos homólogos a o que tienen una elevada identidad de secuencia con las secuencias de SEC ID NO:5 a 8, SEC ID NO:11 o SEC ID NO:12, esto incluye otras porciones de los mismos genes de áfidos o genes de otros insectos chupadores de savia de las plantas que tienen una elevada identidad de secuencia u homología con las secuencias de SEC ID NO:5 a 8, SEC ID NO:11 o SEC ID NO:12. En el diseño de los genes quiméricos de la invención, se prefiere que se usen sólo porciones del gen diana que son conocidas, es decir, aquellas porciones de SEC ID NO: 5 a 8, SEC ID NO:11 o SEC ID NO:12 que no tienen "n" posiciones.

En una realización de esta invención, los genes diana son genes de insectos chupadores de savia de las plantas homólogos con un gen que, cuando se silencia parcial o completamente (o se evita de otro modo que exprese una proteína funcional o ARN) en un insecto, por ejemplo *Drosophila*, da como resultado un mutante con un fenotipo letal (véase, por ejemplo, www.fruitfly.org/p_disrupt/; Spradling et al., 1999; y Adams y Sekelsky, 2002 y referencias citadas allí), particularmente cuando tal gen se expresa en células intestinales de insectos, particularmente en las células intestinales que forran la luz intestinal, especialmente células intestinales que forran el intestino medio. Los homólogos de genes de *Drosophila* se encuentran fácilmente mediante técnicas existentes, por ejemplo mediante amplificación por PCR del gen homólogo de insecto chupador de savia de las plantas usando cebadores dirigidos al gen esencial de *Drosophila* (por ejemplo, en librerías de ADNc o genómicas de un insecto diana preferido), o mediante búsquedas de similitud habituales en bases de datos de secuencias de ADN disponibles de insectos chupadores de savia de las plantas.

Los genes diana también se pueden encontrar usando secuencias similares de genes esenciales de insectos aislados y caracterizados en otros insectos que no son *Drosophila*. En una realización de la invención, el gen diana produce preferiblemente un ARNm estable en el áfido. También, en una realización de la invención, aunque el gen diana se ha de transcribir en el insecto diana, para obtener un efecto de silenciamiento óptimo se prefiere que el gen diana no produzca cantidades abundantes de ARN.

Para ensayar el comportamiento de cierto dsRNA o siRNA en plantas, se puede usar el sistema como se describe en la solicitud publicada PCT WO 03/052108, en la que las plantas producen dsRNA/siRNA y se pueden evaluar los

efectos sobre los ácidos que crecen en plantas. Como control, en paralelo en el mismo constructo vírico, se ensaya un gen no esencial diferente que está ausente en ácidos, tal como un gen que codifica un dsRNA específico de *gfp* (proteína fluorescente verde).

5 También, en el gen quimérico de dsRNA de la invención se puede añadir una señal de localización nuclear, como se describe en la solicitud de patente publicada US 20030180945.

Como se usa aquí, las secuencias nucleotídicas de moléculas de ARN se pueden identificar mediante referencia a secuencias nucleotídicas de ADN del listado de secuencias. Sin embargo, la persona experta en la técnica entenderá si se quiere decir ARN o ADN, dependiendo del contexto. Además, la secuencia nucleotídica es idéntica excepto que la base T se sustituye por uracilo (U) en moléculas de ARN.

10 La longitud de las secuencias nucleotídicas primera (por ejemplo sentido) y segunda (por ejemplo, antisentido) de las moléculas de dsRNA de la invención puede variar desde alrededor de 100 nucleótidos (nt) hasta una longitud igual a la longitud en nucleótidos del transcrito del gen diana. La longitud de la primera o segunda secuencia nucleotídica del dsRNA de la invención puede ser al menos 15 nt, o al menos alrededor de 20 nt, o al menos alrededor de 50 nt, o al menos alrededor de 100 nt, o al menos alrededor de 150 nt, o al menos alrededor de 200 nt,
15 o al menos alrededor de 500 nt, o al menos alrededor de 1600 nt. Si no se conocen todos los nucleótidos en la secuencia del gen diana, se prefiere usar una porción tal para la que se conoce la secuencia y que satisface otros requisitos beneficiosos de la invención.

Se apreciará que cuanto mayor es la longitud total de la primer secuencia nucleotídica en el dsRNA de la invención, menos restrictivos se hacen los requisitos para la identidad de secuencia entre la secuencia nucleotídica sentido total y la secuencia correspondiente en el gen diana. La secuencia nucleotídica primera total puede tener una identidad de secuencia de al menos alrededor de 75% con la secuencia diana correspondiente, pero también se puede usar una mayor identidad de secuencia, tal como al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, alrededor de 100%. La primera secuencia nucleotídica también puede ser idéntica a la parte correspondiente del gen diana. Sin embargo, se advierte que la primera
20 secuencia nucleotídica incluye una secuencia de 19 ó 20, o alrededor de 19 o alrededor de 20 nucleótidos consecutivos, o incluso de alrededor de 50 nucleótidos consecutivos, o alrededor de 100 nucleótidos consecutivos, o alrededor de 150 nucleótidos consecutivos con un solo desemparejamiento, preferiblemente con una identidad de secuencia de 100%, con la parte correspondiente del gen diana. Para calcular la identidad de secuencia y diseñar la primera secuencia nucleotídica correspondiente, se debería minimizar el número de saltos, particularmente para las
25 secuencias sentido más cortas.

La longitud de la segunda secuencia nucleotídica (por ejemplo, antisentido) en el dsRNA de la invención está determinada en gran medida por la longitud de la primera secuencia nucleotídica (por ejemplo, sentido), y puede corresponder a la longitud de la última secuencia. Sin embargo, es posible usar una secuencia antisentido que difiera en longitud en alrededor de 10% sin ninguna dificultad. De forma similar, la secuencia nucleotídica de la
30 región antisentido está enormemente determinada por la secuencia nucleotídica de la región sentido, y puede ser idéntica al complemento de la secuencia nucleotídica de la región sentido. Particularmente con regiones antisentido más largas, es posible sin embargo usar secuencias antisentido con una menor identidad de secuencia con el complemento de la secuencia nucleotídica sentido, tal como al menos alrededor de 75% de identidad de secuencia, o al menos alrededor de 80%, o al menos alrededor de 85%, más particularmente con al menos alrededor de 90%
35 de identidad de secuencia, o al menos alrededor de 95% de identidad de secuencia con el complemento de la secuencia nucleotídica sentido. No obstante, se advierte que la secuencia nucleotídica antisentido siempre incluye una secuencia de 19 ó 20, alrededor de 19 o alrededor de 20 nucleótidos consecutivos, aunque también se pueden usar tramos más largos de nucleótidos consecutivos, tales como alrededor de 50 nucleótidos, o alrededor de 100
40 nucleótidos, o alrededor de 150 nucleótidos con no más de un desemparejamiento, preferiblemente con 100% de identidad de secuencia, con el complemento de una parte correspondiente de la secuencia nucleotídica sentido. Nuevamente, se debería de minimizar el número de saltos, particularmente para las secuencias antisentido más cortas (19 a 50 nucleótidos).

En una realización de la invención, las moléculas de ADN según la invención pueden comprender una región de ADN que codifica un espaciador entre la región de ADN que codifica la primera y segunda secuencias nucleotídicas.
45 Como se indica en el documento WO 99/53050, el espaciador puede contener un intrón para potenciar el silenciamiento génico. Un intrón particularmente preferido, funcional en células de plantas, es el intrón *pdk* (intrón 2 de piruvato ortofosfato dicinasa de *Flaveria trinervia*; véase el documento WO 99/53050), el intrón delta 12 de desaturasa procedente de *Arabidopsis* (Smith et al., 2000) o el intrón del gen *rolA* (Magrelli et al., 1994; Spena y Langenkemper, 1997).

55 En una realización de la invención, la molécula de dsRNA puede comprender además una o más regiones que tienen al menos 94% de identidad de secuencia con regiones de al menos 19 nucleótidos consecutivos procedentes de la secuencia nucleotídica sentido del gen diana, diferentes de los al menos 19 nucleótidos consecutivos como se define en la primera región, y una o más regiones que tienen al menos 94% de identidad de secuencia con al menos

19 nucleótidos consecutivos procedentes del complemento de la secuencia nucleotídica sentido del gen diana, diferentes de los al menos 19 nucleótidos consecutivos como se definen en la segunda región, en el que estas regiones adicionales pueden emparejarse por bases entre ellas.

5 Las plantas a las que se puede aplicar la actual invención incluyen pero no se limitan a las siguientes plantas: maíz, algodón, arroz, haba de soja, plantas de la especie Brassica, Brassica napus, coliflor, zanahoria, guisante, trigo, cebada, centeno, tomate, patata, remolacha, flores de corte, rosas, plantas frutales, manzana, pera, melocotón, fresa, etc.), árboles (tales como álamo y sauce), y lechuga. En una realización de la invención, las plantas a las que se aplica la invención son plantas de algodón o de arroz. Cuando el algodón es la planta hospedante de la invención, el dsRNA selecciona como dianas preferiblemente a genes en uno o todos los siguientes insectos
10 chupadores: Aphis gossypii, Myzus persicae, chinches Lygus, mosca blanca, pentatomoideas, trips, y Creontiades dilutus, particularmente Aphis gossypii, Myzus persicae y Creontiades dilutus.

Junto con la estrategia de esta invención, se prefiere usar otras tácticas para el control de áfidos, tal como la expresión de una lectina de galanto (*Galanthus nivalis*) como se describe por Down et al. (1996), Stoger et al. (1999) y Rao et al. (1998), o las lectinas de unión a manosa de Roy et al. (2002) en plantas, preferiblemente en el floema de plantas, y/o la expresión de un inhibidor de proteasas tal como el inhibidor de tripsina de haba de soja de Kunitz (Foissac et al., 2002), o el inhibidor de tripsina de mostaza variante Chy8 (Ceci et al., 2003) e inhibidores de proteasas similares activos frente a insectos chupadores de savia de las plantas, particularmente áfidos. También, la aplicación en el tiempo de insecticidas químicos o biológicos efectivos, y el uso de depredadores naturales de los áfidos son posibles tácticas a usar. También, se pueden usar genes de resistencia endógena existentes, tales como
15 el gen de resistencia al nematodo *Mi* del tomate (que también confiere resistencia a ciertas especies de áfidos, véase Rossi et al., 1998) o el gen VAT (documento WO 2004072109) para proteger a una planta frente a áfidos y proporcionar diferentes mecanismos de resistencia, minimizando por tanto las oportunidades de desarrollo de resistencia del insecto.

También una planta puede coexpresar proteínas o péptidos antibacterianos, preferiblemente en el floema, para exterminar o afectar de forma negativa a las bacterias simbióticas que aparecen en áfidos, que se cree que proporcionan a los áfidos ciertos compuestos esenciales (tales como aminoácidos) que pueden no obtener suficientemente de la alimentación de la savia de las plantas. Estas proteínas pueden ser uno cualquiera de los péptidos o proteínas antibacterianos que se sabe en la técnica que son efectivos inhibiendo el crecimiento bacteriano, y que se proporcionan preferiblemente con una señal para la selección de dianas extracelulares o para la selección del floema como diana. Tal secuencia señal proteica se puede encontrar en muchas proteínas que están dirigidas al floema, por ejemplo la lectina GNA de galanto descrita anteriormente. También, un dsRNA puede ser expresado en las plantas de la invención, dsRNA el cual selecciona como diana un gen esencial de tal bacteria simbiótica, por ejemplo los genes esenciales descritos por Shigenobu et al. (2000) para el genoma del simbionte bacteriano (*Buchnera* sp.) del áfido del guisante, y formas homólogas para simbioses en otros áfidos.

35 Junto con el dsRNA o siRNAs de la actual invención, un gen quimérico que codifica un oligopéptido catiónico puede ser expresado en plantas. Por "oligopéptido catiónico", como se usa aquí, se quiere decir un oligopéptido mayor que 5 y menor que 40 aminoácidos con una carga positiva neta, y la capacidad para facilitar el transporte de siRNA o dsRNA a través de una membrana celular del insecto. Tales oligopéptidos catiónicos tienen preferiblemente entre 5 y 40 aminoácidos de longitud, entre 10 y 30 aminoácidos de longitud, particularmente alrededor de 12-18 aminoácidos de longitud, más particularmente 12-18 aminoácidos de longitud, y se pueden unir al dsRNA de la invención y estabilizar además el dsRNA, facilitan la entrada del dsRNA en las células de insectos chupadores de savia, particularmente en sus células intestinales, preferiblemente en sus células del intestino medio. En esta realización, tal oligopéptido catiónico, una secuencia de los múltiples péptidos catiónicos citados separados por aminoácidos espaciadores que son escindibles dentro o fuera de la célula, o un oligopéptido catiónico fusionado a una señal dirigida al floema o a otra proteína (tal como la fusión de prosistemina descrita por Tortiglione et al. (2003)), es expresado en las mismas células que el dsRNA o siRNA de la invención, preferiblemente, pero no necesariamente, usando el mismo promotor (en diferentes genes quiméricos, conduciendo a la acumulación del péptido y el dsRNA de la invención en las células vegetales y/o floema. En una realización de esta invención, el oligopéptido catiónico es un 12-mero de poli-arginina (Unnamalai et al., 2004). Otros oligopéptidos catiónicos que se pueden coexpresar en cualquier planta incluyen péptidos de poli-arginina, poli-lisina o poli-histidina de 5 a 40, 10 a 30, ó 12-18 aminoácidos de longitud, o mezclas de cualquiera de estos 3 aminoácidos básicos, o el péptido de penetratina, péptido transportano, péptido TAT, péptido MAP, péptido R7, péptido pVEC, péptido MPG-delta-NLS, péptido KALA o péptido buforina 2, como se describe en Järver y Langel (2004), u otros oligopéptidos menores que 40 aminoácidos con una carga neta positiva, y la capacidad para facilitar el transporte de siRNA o dsRNA a través
45 de una membrana celular del insecto, preferiblemente el péptido MPG-delta-NLS, el péptido de poliarginina de 12 aminoácidos o el péptido TAT. El gen quimérico que codifica el dsRNA y el gen quimérico que codifica el oligopéptido catiónico se pueden ensamblar en un ADN transformante, por ejemplo en un inserto de T-DNA en un plásmido de *Agrobacterium*, para asegurar la expresión de un locus en la planta. Estos oligopéptidos catiónicos son útiles para facilitar la transferencia de cualquier dsRNA o siRNA a las células de cualquier especie de insecto, no sólo los insectos chupadores de savia. Tales insectos incluyen insectos usados como especie modelo, o plagas de insectos de maíz, algodón, arroz, haba de soja, plantas de la especie Brassica, semilla de colza, col, coliflor,
60

zanahoria, guisante, trigo, cebada, centeno, tomate, patata, remolacha, flores de corte, rosas, plantas frutales (manzana, pera, melocotón, fresa, etc.), árboles (tales como álamo y sauce), y lechuga, particularmente el taladrador de maíz europeo, gusanos belloteros del algodón, y gusanos de la raíz del maíz, además de las plagas de insectos chupadores de savia vegetal descritas aquí. Particularmente, tales insectos se seleccionan de la lista que consiste en: *Drosophila melanogaster*, insectos *Anopheles spp.*, *Helicoverpa zea*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa punctigera*, *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Agrotis ipsilon*, *Pectinophora gossypiella*, *Scirphophaga incertulas*, *Cnaphalocrocis medinalis*, *Sesamia inferens*, *Chilo partellus*, *Anticarsia gemmatalis*, *Plathypena scabra*, *Pseudoplusia includens*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera ornithogalli*, *Epinotia aporema*, *Rachiplusia nu*, *Chilo suppressalis*, *Scirphophaga incertulas*, *Sesamia inferens*, *Cnaphalocrocis medinalis*, *Hereitogramma licarisalis*, *Naranga aenescens*, *Mycalesis gotama*, *Marasmia patnalis*, *Marasmia exigua*, *Marasmia ruralis*, *Nymphula depunctalis*, *Scirphophaga innotata*, *Spodoptera litura*, *Chilo polychrysus*, *Rupela albinella*, *Diatraea saccharalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Mythimna unipuncta*, *Chilo zacconius* y *Pamara guttata*, muy particularmente *Chilo suppressalis*, *Scirphophaga incertulas*, *Marasmia patnalis*, *Cnaphalocrocis medinalis*, *Agelastica alni*, *Hypera postica*, *Hypera brunneipennis*, *Haltica tombacina*, *Anthonomus grandis*, *Tenebrio molitor*, *Triboleum castaneum*, *Dicladispa armigera*, *Trichispa serica*, *Oulema oryzae*, *Colaspis brunnea*, *Lissorhynchus oryophilus*, *Phyllotreta cruciferae*, *Phyllotreta striolata*, *Psylliodes punctulata*, *Entomoscelis americana*, *Meligethes aeneus*, *Ceutorynchus sp.*, *Psylliodes chrysocephala*, *Phyllotreta undulata*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Diabrotica barberi*, y *Diabrotica virgifera*. Tales oligopéptidos catiónicos también se pueden suministrar junto con cualesquiera moléculas de dsRNA o siRNA a células de insectos *in vitro* o en cultivo celular (por ejemplo, añadiéndolos al medio de cultivo), o se pueden mezclar con moléculas de dsRNA o siRNA en el alimento del insecto que va a ser alimentado a los insectos, con el objetivo de silenciar ciertos genes diana de insectos. Por tanto, estos péptidos son una herramienta de investigación útil para el análisis de la función génica, mezclándolos (preferiblemente en una relación 1:1) con moléculas de dsRNA o siRNA que se dirigen a ciertos genes de insectos, por ejemplo en un procedimiento de desarrollo de dianas pesticidas como se describe anteriormente.

En esta realización, el dsRNA o siRNA selecciona entonces como diana un gen esencial de este insecto, preferiblemente un gen esencial que es expresado en el intestino, y este dsRNA o siRNA y el oligopéptido catiónico de la invención se pueden administrar *in vitro* a un cultivo celular de una especie de insecto, a un insecto vivo, preferiblemente a una etapa larvaria del mismo, pulverizando en un campo o mediante coexpresión en una planta transgénica en la cual tal especie de insecto tiende a alimentarse.

En una realización de esta invención, la estrategia actual se usa en una planta que ya ha adquirido resistencia parcial o potenciada a insectos chupadores de savia de las plantas, tales como áfidos o moscas blancas, planta la cual se obtiene mediante reproducción y selección normal, o en una planta híbrida que tiene un mejor crecimiento y vigor global.

Los dsRNAs o siRNAs de la actual invención, y el método para aplicarlos al alimento de insectos tales como insectos chupadores de savia de las plantas, también tienen aplicaciones en el desarrollo de insecticidas. Se pueden desarrollar nuevos insecticidas usando el procedimiento de identificar y validar dianas biológicas frente a las cuales se pueden identificar ligandos potenciales (por ejemplo, Margolis y Duyk, 1998). La producción de nuevos insecticidas se puede realizar usando enfoques de descubrimiento a base de dianas. Los genes que, cuando se inactivan parcial o completamente, exterminan el organismo o afectan significativamente al desarrollo normal cuando son apagados o reprimidos, representan dianas interesantes. Para identificar compuestos que tienen el mismo efecto sobre el organismo, se pueden establecer ensayos de identificación de alto rendimiento para ensayar compuestos en busca de su habilidad para interferir *in vitro* con la actividad normal de la diana. Como tal, la invención proporciona un método de identificación de nuevas dianas para compuestos insecticidas, que comprende las etapas de: a) aplicar moléculas de dsRNA o siRNA desnudas, sin empaquetar, al alimento o dieta de un insecto chupador de savia de las plantas; b) analizar qué genes, cuando se silencian, confieren letalidad a dicho insecto; c) clonar y caracterizar dichos genes así analizados; y opcionalmente d) identificar compuestos que destruyen o inactivan a dicho gen o a la proteína codificada de ese modo; y e) poner en contacto dichos compuestos químicos con dicho insecto o alimento o dieta de dicho insecto para confirmar la naturaleza plaguicida de dicho compuesto. En una realización de esta invención, este dsRNA o siRNA sin empaquetar se puede suministrar junto con un oligopéptido catiónico como se describe aquí para aplicaciones a cualquier especie de insecto.

Las plagas diana preferidas son insectos chupadores de savia de las plantas, particularmente del orden Hemiptera, preferiblemente insectos del suborden Homoptera o Heteroptera, preferiblemente áfidos y moscas blancas, particularmente insectos de la familia Aphididae. La invención es aplicable de forma similar a cualesquiera insectos chupadores de savia de las plantas que se alimenten del xilema usando un promotor constitutivo o un promotor específico de xilema. Los ejemplos promotores específicos del xilema (es decir, promotor preferente pero no necesariamente activo de forma exclusiva en el xilema) incluyen, pero no se limitan a, el promotor Pal2, por ejemplo de haba (Leyva et al., 1992), los promotores poxN o poxA del arroz (Ito et al., 2000), el promotor PtCesA (Wu et al., 2000), el promotor XCP1 (Funk et al., 2002), el promotor del virus de la hoja rizada de algodón (Yingqiu et al., 2000), el elemento promotor vs-1 (Torres-Schumann et al., 1996).

“Insectos chupadores de savia de las plantas”, como se usa aquí, son insectos que se alimentan en plantas usando sus partes afiladas de la boca, que se pueden insertar en una planta para captar fluido del sistema vascular de la planta; en una realización, estos son insectos que se alimentan directamente de los fluidos en el sistema vascular de la planta, preferiblemente insectos que sólo se alimentan de los fluidos en el sistema vascular de la planta. En la etapa de inserción, también se pueden lesionar las células vegetales, que pueden o no ser usadas como una fuente de alimento por el insecto chupador de savia de las plantas. Estos insectos son plagas de plantas debido a que su alimentación reduce la vitalidad de las cosechas de las que se alimentan, y pueden transmitir enfermedades víricas. También, muchos de tales insectos chupadores de savia segregan un fluido rico en azúcar, denominado secreción dulce, que se acumula en las partes inferiores de las plantas, y tales plantas se cubren pronto de ciertos hongos negros o marrones conocidos como mohos de hollín, interfiriendo por tanto con la fotosíntesis de la planta.

Incluidos en tales insectos chupadores de savia de las plantas están los áfidos o insectos homópteros de los Aphididae, y los insectos chupadores de savia de las plantas como se usa aquí incluyen, pero no se limitan a, el pulgón del melocotonero *Myzus persicae*, el pulgón de la haba *Aphis fabae*, el pulgón del guisante *Acyrtosiphum pisum*, el pulgón de la col *Brevicoryne brassicae*, el pulgón del cereal *Sitobion avenae*, el pulgón del cereal rosa *Metopolophium dirhodum*, el pulgón del trigo ruso *Diuraphis noxia* (Mordvilko), el pulgón del cereal inglés *Macrosiphum avenae*, el pulgón verde de los cereales *Schizaphis graminum* (Rondani), el pulgón de la zanahoria *Cavariella aegopodii*, el pulgón de la patata *Macrosiphum euphorbiae*, el pulgón del cacahuate *Aphis craccivora*, el pulgón del algodón *Aphis gossypii*, el pulgón negro de los cítricos *Toxoptera aurantii*, el pulgón marrón de los cítricos *Toxoptera cidius*, el pulgón del sauce *Cavariella* spp., el pulgón de la hoja de maíz *Rhopalosiphum maidis*, el pulgón *Rhopalosiphum padi*, los pulgones de la hoja del sauce *Chaitophorus* spp., los pulgones negros del pino *Cinara* spp., el pulgón del sicomoro *Drepanosiphum platanoides*, los pulgones del abeto falso *Elatobium* spp., *Aphis citricola*, *Lipaphis pserudobrassicae* (pulgón del nabo), *Nippolachnus piri*, el pulgón de las solanáceas *Aulacorthum solani*, el pulgón del espárrago *Brachycorynella asparagi*, el pulgón marrón de ambrosía *Uroleucon ambrosiae*, el pulgón del espino cerval *Aphis nasturtii*, el pulgón de la raíz del maíz *Aphis maidiradicis*, el pulgón del lirio de media luna *Neomyzus circumflexes*, el pulgón del brillo dorado *Dactynotus rudbeckiae*, el pulgón de la madreSelva y chirivía *Hyadaphis foeniculi*, el pulgón de la ciruela de hoja rizada *Brachycaudus helichrysi*, el pulgón de la raíz de la lechuga *Pemphigus bursarius*, el pulgón de la menta *Ovatus crataegarius*, el pulgón de la alcachofa *Capitophorus elaeagni*, el pulgón de la cebolla *Neotoxoptera formosana*, el pulgón del guisante *Macrosiphum pisi*, el pulgón de la ciruela mohosa *Hysteroneura setariae*, el pulgón del cebollino *Myzus ascalonicus*, el pulgón de la raíz de la patata *Smynthuroides betae*, el pulgón de la raíz de la remolacha *Pemphigus betae*, el pulgón del bulbo de tulipán *Dysaphis tulipae*, el pulgón de la raíz de la margarita del oeste *Aphis armoraciae*, el pulgón de la raíz de la margarita blanca *Prociphilus erigeronensis*.

También están incluidos aquí, como insectos chupadores de savia de las plantas, moscas blancas o insectos Aleyrodidae, tales como *Trialeurodes vaporariorum* (mosca blanca de invernadero), la mosca blanca de ala con bandas *Trialeurodes abutilonea*, *Bemisia tabaci* (mosca blanca de la batata) y *Bemisia argentifolli* (mosca blanca del mal del plomo del ciruelo). También están incluidos aquí, como insectos chupadores de savia de las plantas, pulgas saltadoras tales como *Pseudatomoscelis seriatus* o pulga saltadora del algodón, y *Halticus bractatus* o altica de jardín, *Pentatomidae* (pentatomoideas, por ejemplo, *Thyanta* spp.), chinches harinosas (Hemiptera, *Coccoidea*, *Pseudococcidae*, por ejemplo, el chinche harinoso de los cítricos (género *Pseudococcus*)), así como *Delphacidae* (o saltadores de plantas) tales como *Laodelphax striatellus* (saltador marrón pequeño), *Nilaparvata lugens* (saltador marrón del arroz) y *Sogatella furcifera* (saltador del arroz de espalda blanca), y *Deltocephalidae* (o saltadores de hojas) tales como *Flexamia DeLong* spp., *Nephotettix cincticeps* y *Nephotettix virescens*, *Amrasca biguttula*, y el saltador de hojas de la patata *Empoasca filament*. También están incluidos escamas (también llamados insectos de escamas) tales como *Aonidiella aurantii* (escama rojo de California), *Comstockaspis pemiciosa* (escama de San José), *Unaspis citri* (escama nevado de los cítricos), *Pseudaulacaspis pentagona* (escama blanco del melocotón), *Saissetia oleae* (escama marrón del olivo), *Lepidosaphes beckii* (escama púrpura), *Ceroplastes rubens* (escama rojo de la cera) e *Icerya purchasi* (escama de la almohada de algodón), además *Tingidae* (o chinches de lazo) e insectos *Psyllidae*, y chinches escupidores.

Están incluidos adicionalmente, como insectos chupadores de savia de las plantas, insectos heterópteros e insectos hemípteros de los auquenorrincos que se alimentan del sistema vascular de las plantas, tales como insectos chupadores de savia de los cicádidos (tales como cigarras), cercopoideos (chinches escupidoras o saltadores rana), membracoideos (saltadores de hojas y saltadores de árboles), y fulgoroideos (saltadores de plantas), por ejemplo, el chinche chupador de la semilla del algodón *Dysdercus peruvianus* (Heteroptera, *Pyrrhocoridae*), el chinche de los hoyuelos de la manzana, *Campylomma liebkechti* (Hemiptera: *Miridae*) y el mirido verde, *Creontiades dilutus* que son plagas de insectos chupadores del algodón, y las chinches *Lygus* (Hemiptera: *Miridae*, por ejemplo, *Lygus hesperus*).

En una realización de esta invención, los insectos chupadores de savia de las plantas que se alimentan del floema son seleccionados como dianas con los métodos de la invención, particularmente áfidos, saltadores de plantas y moscas blancas.

El constructo del gen quimérico de dsRNA o siRNA también puede estar presente en una planta que ya expresa una

5 proteína insecticida, por ejemplo una proteína insecticida derivada de *Bacillus thuringiensis*. Las plantas preferidas que expresan tales proteínas incluyen, pero no se limitan a: plantas de maíz que contienen el suceso de transformación MON863, plantas de maíz que contienen el suceso de transformación MON810, plantas de maíz que contienen el suceso de transformación Bt11, plantas de maíz que expresan una proteína Cry1F, plantas de maíz que expresan una proteína Cry1Ac o plantas de algodón que expresan una proteína Cry1Ac y una proteína Cry2Ab (Bollgard™ I o II), plantas de algodón que expresan una proteína Cry1 F, una proteína híbrida Cry1 F/1Ac o una proteína VIP3A, y plantas de maíz o de algodón que combinan tales sucesos transgénicos en la misma especie vegetal.

10 En los Ejemplos a continuación se muestran realizaciones preferidas de la invención, que son una selección de posibles realizaciones y una ilustración de la invención. Es evidente que se puede cambiar una variedad de parámetros no críticos para dar el mismo o esencialmente el mismo resultado.

Las siguientes secuencias se adjuntan a esta solicitud en el listado de secuencias:

SEC ID NO: 1 – secuencia de ADN de cebador degenerado diseñado del cebador eIF1A-F

15 SEC ID NO: 2 – secuencia de ADN de cebador degenerado diseñado del cebador eIF1A-R (n en la posición 20 es incierto y puede ser a, c, g, o t).

SEC ID NO: 3 – secuencia de ADN de cebador degenerado diseñado del cebador de alfa-tubulina-F

SEC ID NO: 4 – secuencia de ADN de cebador degenerado diseñado del cebador de alfa-tubulina-R

SEC ID NO: 5 – secuencia de ADN del fragmento de PCR del gen de *A. gossypii* eIF1A

SEC ID NO: 6 – secuencia de ADN del fragmento de PCR del gen de *M. persicae* eIF1A

20 SEC ID NO: 7 – secuencia de ADN del fragmento de PCR del gen de alfa-tubulina de *A. gossypii* (n en las posiciones 591, 592 y 637 es incierto y puede ser a, c, g, o t)

SEC ID NO: 8 – secuencia de ADN del fragmento de PCR del gen de alfa-tubulina de *M. persicae* (n en las posiciones 3, 113, 128, 137, 509, 615, 617, y 627 es incierto y puede ser a, c, g, o t)

SEC ID NO: 9 – secuencia de cebador diseñado del cebador directo del dominio de EcR C de *Myzus persicae*

25 SEC ID NO: 10 – secuencia de cebador diseñado del cebador inverso del dominio de EcR E de *Myzus persicae*

SEC ID NO: 11 – secuencia de ADN del fragmento de PCR de EcR de *Myzus persicae*

SEC ID NO: 12 – secuencia de ADN del fragmento del gen de alfa-actinina de *Myzus persicae* (n en la posición 704 es incierto y puede ser a, c, g o t).

30 Excepto que se señale de otro modo en los Ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo según protocolos estándar como se describe en Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, en Volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA y en los Volúmenes I y II de Brown (1998) *Molecular Biology LabFax*, Segunda Edición, Academic Press (UK). Los materiales y métodos estándar para el trabajo molecular con plantas se describen en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) de R.D.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications, UK. Los materiales y métodos estándar para las reacciones en cadena de la polimerasa se pueden encontrar en Dieffenbach y Dveksler (1995) *PCR Primer. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y en McPherson et al. (2000) *PCR - Basics: From Background to Bench*, Primera Edición, Springer Verlag, Alemania. En el sitio web de Ambion, www.ambion.com, se puede encontrar información detallada y referencias sobre la interferencia de ARN.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Inyección y alimento de áfidos con dsRNA

Cría de insectos

35 Se criaron *Aphis gossypii* en plantas de algodón de 3-5 semanas, a 25°C bajo un ciclo de luz/oscuridad de 14 horas:10 horas, con una humedad baja a media. En cada planta, semanalmente, se colocaron entre 5 y 10 adultos ápteros. Se criaron *Myzus persicae* en plantas de rábano de 3-5 semanas, a 20°C bajo un ciclo de luz/oscuridad de 14 horas:10 horas con una humedad baja a media. En cada planta se colocaron entre 10 y 15 adultos ápteros cada dos semanas.

Amplificación mediante PCR y análisis de secuencias de los genes de áfidos

Se extrajo ARN total de una población de áfidos de etapas de vida mixtas usando un Qiagen RNeasy Minikit™, según las especificaciones del fabricante. El ARN (~250 ng) se usó para preparar ADNc usando el Invitrogen's ThermoScript RT-PCR System™, usando cebadores oligo(dT). El ADNc resultante se usó entonces como molde para la amplificación del factor de iniciación eucariota. Se diseñaron cebadores de PCR degenerados para abarcar regiones moderada a altamente conservadas del gen del factor 1A de iniciación eucariota (eIF 1A) y los genes de alfa-tubulina, basado en alineamientos de múltiples secuencias de genes de invertebrados derivados de GenBank. Las secuencias se alinearon y se generaron múltiples comparaciones de secuencias usando el programa de GCG "Pileup" o "CLUSTAL W" con parámetros por defecto para las secuencias nucleotídicas y la matriz de puntuación por defecto para las proteínas. Se diseñaron cebadores para cubrir un único exón putativo siempre que fuera posible. Las predicciones de exones se basaron habitualmente en fronteras de exones encontradas en el ortólogo de *Drosophila melanogaster* del gen diana. Para ayudar al proceso de diseño, se usó el programa CODEHOP (Blocks Server, <http://www.blocks.fhrc.org>).

Tabla 1. Cebadores de PCR usados para aislar secuencias génicas de *A. gossypii* y *M. persicae*

Cebadores	Secuencia de los cebadores
Cebadores de EIF 1A:	
EIF1A-F (SEC ID NO:1)	5' AAA ACA GAA GAA GAG GTA AAA AYG ARA 3'
EIF1A-R (SEC ID NO:2)	5' GGT TTC TGG CTT CGT CTG GNG TRT AYT T 3'
Cebadores de alfa-tubulina:	
Tubulina-F (SEC ID NO:3)	5' TAC AAC TCS ATC YTG ACC AC 3'
Tubulina-R (SEC ID NO:4)	5' TCC ATR CCY TCW CCB ACR TAC C 3'

Las amplificaciones de los genes diana se llevaron a cabo usando el Invitrogen's ThermoScript RT-PCR System, con *Taq* DNA polimerasa de Platinum, en un Corbett Research Thermocycler. Se ensayó un intervalo de temperaturas de hibridación (0,5 a 5 grados por debajo de la T_m de los cebadores) y un intervalo de concentraciones de $MgCl_2$ (0 a 3,0 mM) para encontrar las condiciones que produjeron la cantidad máxima de producto de PCR específico. Se usaron las siguientes condiciones de PCR: 94°C durante 2 min., 30 ciclos de [94°C durante 30 segundos; 47-52°C durante 30 segundos; 72°C durante 90 segundos], y 72°C durante 3 minutos.

Los productos de la PCR se purificaron en gel usando un Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf), y se subclonaron en el plásmido pGEM-T-Easy (Promega). El ADN plasmídico aislado se secuenció usando cebadores complementarios a los promotores T7 y SP6 en el vector. El ADN se secuenció usando química terminadora de BigDye-terminator (Applied BioSystems) según las especificaciones del fabricante, y las reacciones de secuenciación se resolvieron y se procesaron mediante un secuenciador de ADN automatizado Applied BioSystems Modelo 377XL.

Las secuencias de ADN se editaron para eliminar secuencias plasmídicas, y se llevaron a cabo comparaciones por parejas usando el programa de alineamiento de GCG "Gap" (Devereux et al., 1984), y se generaron múltiples comparaciones de secuencias y secuencias de consenso usando el programa de GCG "Pileup" (Devereux et al., 1984) o "CLUSTALW" (Thompson et al., 1994), con los parámetros por defecto (peso del salto 5,0, peso de la longitud del salto 0,3) para secuencias nucleotídicas.

Se amplificó un único producto de PCR de 279 nt de longitud a partir de ADNc de *A. gossypii* y *M. persicae* usando los cebadores de eIF mencionados anteriormente. Cada producto de la PCR se secuenció, y, basándose en comparaciones de secuencias de ADN con otros genes de eIF de invertebrados, se confirmó que ambos eran fragmentos del gen de eIF. La SEC ID NO:5 y 6 muestra las secuencias de ADN de los fragmentos de PCR de eIF 1A de *A. gossypii* y *M. persicae*, respectivamente.

Las secuencias de los fragmentos de PCR de alfa-tubulina de *A. gossypii* y *M. persicae*, que corresponden a los genes encontrados en la librería de ADNc de estos insectos, se muestran en SEC ID NO:7 y 8, respectivamente.

Usando el protocolo anterior, también se determinaron secuencias de ADN para el gen de alfa-actinina de *A. gossypii*, para el gen de acetilcolinesterasa y para el gen del factor 1-alfa de alargamiento, basándose en las secuencias disponibles de los ortólogos de *Drosophila* de estos genes en los números de acceso de Genbank NM058137 (alfa-actinina), X05893 (acetilcolinesterasa), o basándose en la secuencia disponible del ortólogo de *M.*

persicae del gen del factor 1-alfa de alargamiento en el número de acceso Genbank AF143612.

Usando un procedimiento similar como se describe anteriormente para los genes de eIF y de alfa-tubulina, también se aisló una secuencia de ADN de un gen de alfa-actinina de *Myzus persicae*. Esta secuencia se muestra en SEC ID NO: 12.

5 Preparación de ARN bicatenario

Para facilitar la síntesis in vitro de dsRNA, se subclonó el fragmento génico del plásmido pGEM-T-Easy en el plásmido pL4440 (Timmons y Fire, 1998), un plásmido con dos promotores T7 convergentes. La transcripción a partir de este plásmido requiere el uso de sólo T7 RNA polimerasa para producir simultáneamente tanto ARN sentido como antisentido, que se hibridará in vitro para formar dsRNA.

10 El plásmido pL4417 (descrito en Fire Lab 1997 Vector Supplement, Febrero de 1997, proporcionado por Andrew Fire, Carnegie Institute; Timmons et al., 2001) contiene el gen de la proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria*, gfp, flanqueado por dos promotores T7 convergentes. Este plásmido se usó para preparar dsRNA de todo el marco de lectura abierto (716 nt) del gen de gfp, para evaluar si el dsRNA no específico de áfidos tuvo algún efecto perjudicial sobre los áfidos.

15 Para obtener un molde de ADN suficiente para transcripciones in vitro, se amplificaron mediante PCR el fragmento génico del áfido y las secuencias del promotor T7 flanqueantes a partir del plásmido pL4440 usando cebadores específicos de plásmidos.

Se preparó ARN bicatenario usando un sistema de producción de ARN a gran escala T7 RiboMAX Express (Promega) según las especificaciones del fabricante.

20 Bioensayos de insectos

Para ensayar si el dsRNA de eIF1A de *A. gossypii* fue funcional silenciando el gen del áfido, se realizaron inyecciones en el hemocelo de dsRNA dirigido a este gen de áfido en hembras adultas de *A. gossypii*, y se comparó la mortalidad en el tiempo y la fecundidad con *A. gossypii* de control, inyectado con tampón o inyectado con dsGFP (proteína fluorescente verde). Se inyectaron 25 adultos de ápteros con 1 microg/microl de dsRNA en tampón de inyección (5 mM de KCl, 0,1 M de fosfato de sodio, pH 6,8). De forma similar, se inyectaron 10 adultos ápteros con dsGFP (1 microg/microl) en tampón de inyección, y se inyectaron 10 adultos ápteros con la inyección de tampón solamente. Los áfidos inyectados se colocaron individualmente en arenas que contienen la dieta artificial para áfidos descrita más abajo. La mortalidad de los adultos y el número de ninfas vivas se registró a 3, 7, 11, y 14 días después de la inyección, después de lo cual se terminó el experimento. Este régimen se repitió tres veces, de manera que se inyectó un total de 75 adultos con el dsRNA específico para áfidos. La inyección de dsRNA de eIF dio como resultado que muriese un porcentaje considerable (29%) de adultos de *A. gossypii* en 3 días tras la inyección, y los restantes áfidos inyectados continuaron muriendo durante las siguientes 2 semanas. En comparación, murieron considerablemente muy pocos áfidos a los 3 días después de la inyección cuando se les inyectó dsRNA de GFP (3%) o inyección de tampón (7%).

35 Las inyecciones de *M. persicae* con dsRNA de eIF de *M. persicae* también exterminó algunos áfidos, pero las tasas de mortalidad en este experimento no parecieron ser significativas cuando se compararon con controles inyectados con dsRNA de GFP o inyectados con tampón (se observó una gran variación en los controles y el tratamiento).

40 Para aquellas hembras de *A. gossypii* que sobrevivieron al tratamiento con la inyección, se evaluó su producción de ninfas durante un período de dos semanas. El número acumulativo de ninfas producidas a 7, 11, y 14 días después de la inyección fue similar para todos los tratamientos, no teniendo el dsRNA específico para áfidos ningún efecto significativo sobre la reproducción de las hembras tratadas que sobrevivieron.

De forma similar, se amplificó una porción del gen del receptor de ecdisona (EcR) de *Myzus persicae* a partir de ADNc de *M. persicae* usando las siguientes secuencias de cebadores de PCR:

45 Cebador directo del dominio C de MpEcR: 5' CCCAAGCTTTGCCTGGTGTGTGGCGACCGG 3' (SEC ID NO:9).

Cebador inverso del dominio E de MpEcR: 5' CCCAAGCTTATCCTGGAAATAGACAAGTCG 3' (SEC ID NO:10).

Los adaptadores subrayados se añadieron para proporcionar un sitio HindIII para la subclonación en un vector de expresión de dsRNA.

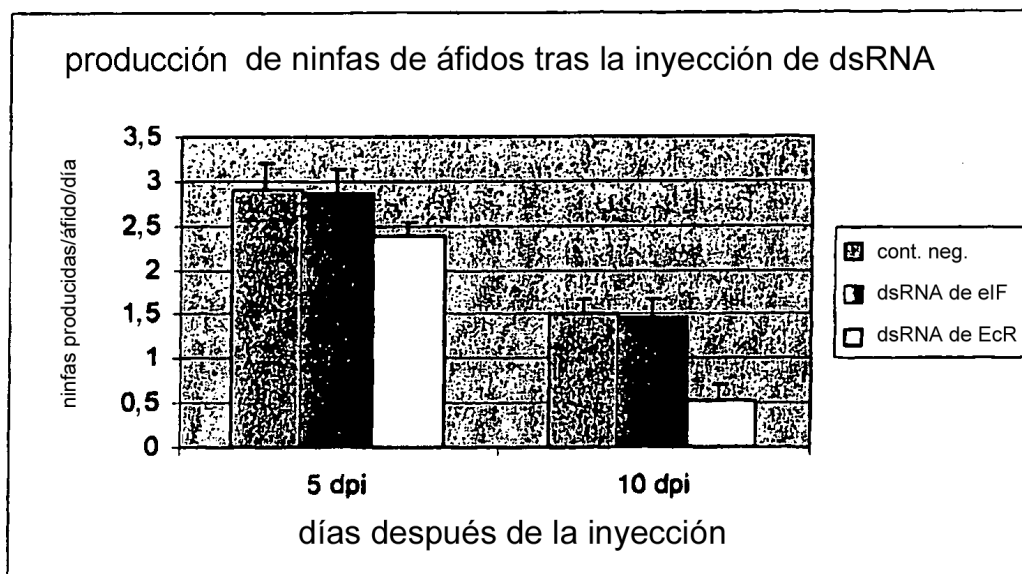
50 El producto de la PCR de alrededor de 450 pb se purificó en gel usando un kit Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf), y se subclonó en el plásmido pGEM-T-Easy (Promega). Los fragmentos génicos del plásmido pGEM-T-Easy se subclonaron en el plásmido pL4440 (proporcionado amablemente por Andrew Fire), un plásmido con dos

promotores T7 convergentes. La transcripción de este plásmido requiere el uso de sólo T7 RNA polimerasa para producir simultáneamente tanto ARN sentido como antisentido, que se hibridará *in vitro* para formar dsRNA. El ARN bicatenario se preparó usando un sistema de producción de ARNM a gran escala T7 RiboMAX Express (Promega), según las especificaciones del fabricante.

- 5 SEC ID NO:11 muestra la secuencia de ADN del receptor de ecdisona de *Myzus persicae* que codifica desde el inicio del dominio C hasta el resto 15° del dominio E (alrededor de 450 pb).

Se inyectaron hembras adultas de dos a tres días en sus hemocelos abdominales con 50 nl de tampón, con o sin 1 ug/ul de dsRNA (eIF1A o EcR). Los áfidos se anestesiaron usando CO₂, y se sujetaron a un portaobjetos de microscopio revestido con una capa seca, pegajosa de sacarosa al 20%. Los insectos fueron inyectados usando agujas de vidrio de borosilicato, preparadas usando un extractor de micropipetas (Sutter Instruments) y algunas veces afiladas con un biselador de agujas (Narashige). La aguja se operó usando un micromanipulador (Narashige) asegurado a un estereomicroscopio, y se suministró el fluido con la ayuda de una bomba accionada por aire controlada por un interruptor de solenoide operado con el pie. Los áfidos inyectados se lavaron de la almohadilla de sacarosa, y se transfirieron a arenas de alimentación individuales. Las arenas consistieron en pequeños cilindros de plástico (1,5 cm de diámetro interno), cerrados en un extremo con un cubreobjetos de microscopio de vidrio, y en el otro extremo con dos membranas de Parafilm. Entre las dos membranas de Parafilm había una dieta líquida artificial (véase más abajo), y se monitorizó la supervivencia de los áfidos inyectados y el número de ninfas que produjeron durante un periodo de 10 días.

20 No se observó ningún incremento en la mortalidad de áfidos para áfidos de *M. persicae* inyectados con dsRNA de EcR. Los áfidos inyectados solamente con tampón o con dsRNA de eIF produjeron un número similar de ninfas en los días 5 y 10 después de la inyección (Figura 1). Los áfidos inyectados con dsRNA de EcR produjeron significativamente menor número de ninfas después del día 10 ($n = 25$, prueba de la *t* de Student, $P < 0,01$), sugiriendo que, aunque el dsRNA inyectado tardó cierto tiempo en promover un efecto sobre la producción de ninfas, afectó seriamente la fecundidad de los insectos.



25 Figura 1. Producción de ninfas de *M. persicae* hembras adultas inyectadas con dsRNA. Los áfidos se inyectaron con tampón solo (cont. neg.) o con dsRNA de eIF o de EcR. Los resultados representan la media y errores estándar para $n = 25$ áfidos para cada uno de los tres tratamientos.

30 También, la inyección de dsRNA de alfa-tubulina de *Aphis gossypii* en el hemocelo de estos áfidos muestra que la mortalidad de los áfidos aumenta en comparación con inyecciones de dsGFP de control. Por tanto, la secuencia de tubulina de *A. gossypii* de SEC ID NO: 7, o el gen correspondiente a esta secuencia, es otro posible gen diana.

35 Para los ensayos de alimentación, se colocaron tres a cuatro áfidos *A. gossypii* hembras adultas en arenas de alimentación individuales, y se dejaron durante 24 h. Los adultos se retiraron entonces, dejando a las ninfas neonatas desarrollarse completamente en las dietas artificiales que contienen dsRNA. Las arenas consistieron en pequeños cilindros de plástico (1,5 cm de diámetro interno) cerrados en un extremo con un cubreobjetos de microscopio de vidrio o película plástica, y en el otro extremo con dos membranas de Parafilm. Entre las dos membranas de Parafilm había un total de 100 microlitros de dieta líquida artificial, que contiene 1 microgramo/microlitro de dsRNA (gfp o eIF) o 10 microlitros de tampón de dilución de ARN (10 mM de Tris, pH 8,0).

Se reunieron tres a cinco preparaciones independientes de dsRNA de eIF y de gfp, para proporcionar cantidades suficientes de dsRNA (5 mg) para los bioensayos de alimentación. La dieta artificial se preparó como una disolución madre 2x, de manera que, tras la adición de dsRNA y tampón, la concentración final de la dieta se pudiese diluir hasta una concentración 1x añadiendo el volumen apropiado de agua. Se montaron entre 45 y 50 arenas para cada tratamiento (tampón, dsRNA de gfp, y dsRNA de eIF), partiendo de, de media, 40 ninfas por arena en el primer día. Se registró el número de áfidos vivos en los días 3, 7 y 11, y se calculó el porcentaje de áfidos que sobreviven para cada arena, con relación al día 1.

La dieta artificial usada incluye, para 9 ml (todos los ingredientes tienen calidad de cultivo celular): disolución madre de aminoácidos (1 ml), disolución madre de vitaminas (0,3 ml), sacarosa al 80% (3,125 ml), tampón de fosfato de potasio y sodio (1 ml), ovoalbúmina (10 mg), MgCl₂ (10 mg), sales de Wesson (10 mg), agua (3,57 ml). La disolución de tampón de potasio y sodio (100 mM, pH 7,0) contiene: NaH₂PO₄: 1,4 g; K₂HPO₄: 2,6 g, ácido ascórbico: 0,25 g, ajustada a pH hasta 7,0, mezclado con 250 ml de agua (no se almacena; se obtiene una cantidad para uso inmediatamente en la dieta que se almacena). La dieta se mezcla, se filtra en filtros de 0,2 µm y se almacena en tubos de 5 ml a -70°C. Se prepara una gran cantidad, que se almacena en el congelador durante ± 6 meses. Justo antes de un bioensayo, se añaden antibióticos: a 9 ml de dieta, 20 µl de eritromicina (10 mg/ml de EtOH), 10 µl de triacilina (100 mg/ml), 5 µl de cloranfenicol (60 mg/ml), 6 µl de canamicina (50 mg/ml). Esto tiene cierto efecto negativo sobre el crecimiento de las larvas, y se puede omitir cuando se trabaja con muestras libres de células.

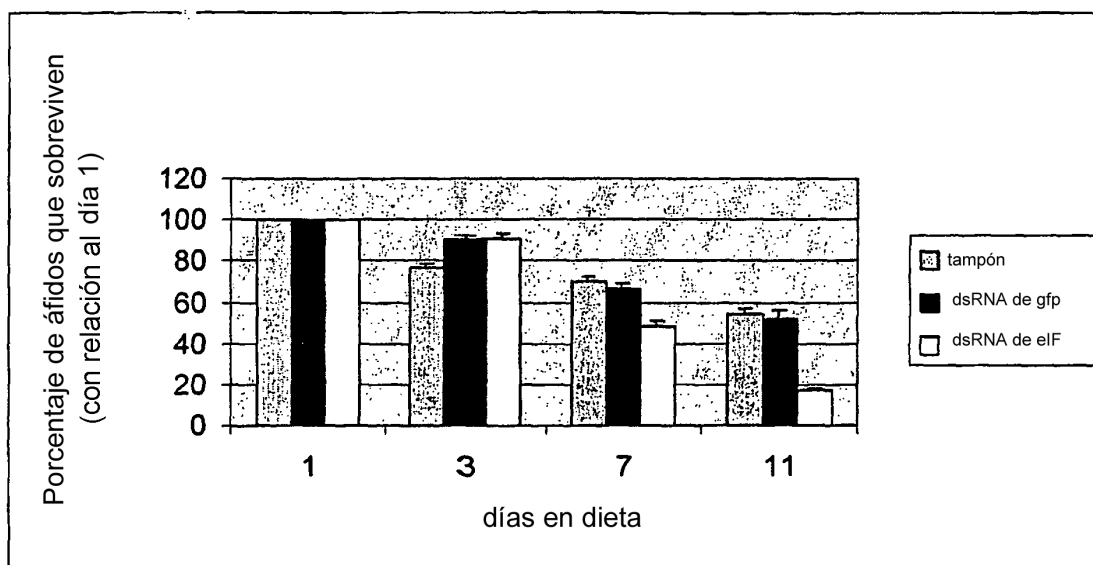
La disolución madre de aminoácidos contiene (todos L-aminoácidos; se indican entre paréntesis las concentraciones finales en mM): glutamina (32,8), serina (25,5), arginina (10,7), valina (7,1), treonina (6,9), leucina (5,1), lisina (5,1), isoleucina (4,4), fenilalanina (2,8), histidina (2,2), metionina (1,6), alanina (1,6), triptófano (0,9).

La disolución madre de vitaminas contiene (entre paréntesis mg/10 ml): biotina (0,1), capatotenato (5), cloruro de colina (50), mio-inositol (50), niacina (10), piridoxina (2,5), tiamina-HCl (2,5).

La disolución madre de aminoácidos y la disolución madre de vitaminas no se almacenan: se prepara una cantidad para uso inmediatamente en la dieta que se almacena.

La alimentación de dsRNA de eIF1A a ninfas de *A. gossypii* dio como resultado una reducción significativa en la supervivencia de las ninfas (Figura 2). Después de 11 días, sólo sobrevivieron 17 (± 1,4) % de los áfidos alimentados en la dieta que contiene dsRNA de eIF, mientras que sobrevivieron 54 (± 4,1) y 51 (± 2,8) % de los áfidos alimentados en la dieta que contiene tampón o dsRNA de gfp. Por tanto, hay un incremento de dos veces en la mortalidad de áfidos debido a la presencia del dsRNA de eIF en la dieta. Las pruebas de la t de Student confirmaron que la alimentación de dsRNA de eIF redujo significativamente la supervivencia de áfidos, con relación a áfidos alimentados con tampón o con dsRNA de gfp (P < 0,0001).

Figura 2. Supervivencia de *A. gossypii* en la dieta que contiene dsRNA. Los áfidos neonatos (aproximadamente 40/arena) se alimentaron con dieta que contiene 1,0 microgramo/microlitro de dsRNA (gfp o eIF), y el número de áfidos supervivientes se evaluó en los días 3, 7 y 11. Se calculó el porcentaje de áfidos que sobreviven (con relación al día 1). Los valores representan la media +/- error estándar para > 45 réplicas.



Estos datos de una mortalidad significativamente mayor de áfidos cuando se les alimenta con dsRNA se han confirmado en otro experimento en el que se usó un número más pequeño de áfidos, pero usando un montaje experimental similar como antes (usando también el dsRNA de eIF1A de *A. gossypii* a ninfas de *A. gossypii*).

5 Un montaje experimental similar con áfidos de *M. persicae* y un dsRNA basado en la secuencia de eIF1A de *M. persicae* anterior (SEC ID NO: 6) confirma que se obtiene una mortalidad significativa cuando se alimenta a estos áfidos con moléculas de dsRNA desnudas, sin empaquetar, en su dieta.

Estos resultados muestran que, sorprendentemente, se encuentra una mortalidad significativa en áfidos alimentados con dsRNA desnudo, sin empaquetar, dirigido a un gen esencial de áfidos.

10 También, la mortalidad de los insectos y el silenciamiento eficiente se obtiene usando moléculas de ARN de interferencia pequeño (siRNA) directamente en la dieta de los áfidos. Para 3 genes diana (eIF, tubulina y GFP), siRNA se prepara mediante escisión de dsRNA largo usando el (Kit de Cóctel de siRNA Silenciador de Ambion, que genera siRNAs de 12-30 pb) o dicer humano recombinante (Gene Therapy Systems, que produce siRNAs de 21-23 pb (más óptimos)). Los áfidos se alimentan con dieta artificial que contiene una concentración de dsRNA largo y siRNAs, para determinar la diferencia en eficacia. La aplicación de moléculas de siRNA en la dieta de áfidos también produce un efecto significativo sobre el desarrollo de los áfidos, comparable a o incluso mejor que el dsRNA más largo aplicado anteriormente.

15 La adición de un oligopéptido catiónico 12-mérico de poliarginina a la dieta de áfidos, junto con el dsRNA de eIF1A, da como resultado una mortalidad significativamente aumentada en los ensayos de alimentación anteriores frente a *A. gossypii* y *M. persicae*, en comparación con la aplicación de dsRNA sin tal péptido y un montaje de control que usa dsRNA de GFP.

Ejemplo 2: análisis de la alimentación de áfidos en plantas que expresan transitoriamente dsRNA.

25 Para confirmar que las plantas pueden suministrar dsRNA o siRNA a insectos chupadores de savia de las plantas, tales como áfidos, *in planta* sin agentes promotores de la transfección, los áfidos se añadieron a plantas de tabaco que fueron inducidas transitoriamente a producir dsRNA de áfidos usando la metodología SVISS descrita en la solicitud PCT publicada WO 03/052108, usando dsRNA dirigido a un gen esencial de *M. persicae*.

Estos experimentos confirman que el dsRNA producido transitoriamente en plantas en una forma sin empaquetar, libre de agentes que promueven la transfección, puede dar como resultado una inhibición significativa del desarrollo de *M. persicae*.

Ejemplo 3: análisis de la alimentación de áfidos en plantas que expresan de forma estable dsRNA en floema.

30 En este experimento comparativo, plantas de *Arabidopsis* y de tabaco se transformaron mediante transformación mediada por *Agrobacterium* con un vector que contiene un gen quimérico de dsRNA que selecciona como diana el gen de eIF1A de *M. persicae*, el gen del receptor de ecdisona (EcR) de *M. persicae* o el gen de GFP de control. Se clonó una secuencia de ADN del receptor de ecdisona de *M. persicae* a partir de este áfido como se describe anteriormente. Se obtuvo un gen quimérico de dsRNA de la planta, en el que el promotor rolC específico del floema (Pandolfini et al., 2003) o el promotor de CaMV 35S constitutivo está enlazado operablemente al constructo de dsRNA, que contiene regiones sentido y antisentido al gen del áfido diana anterior o el gen de control. Las plantas se ensayaron para determinar la transformación usando el análisis de transferencia Southern, y para determinar la expresión y el corte mediante enzima dicer del dsRNA mediante ensayo de transferencia Northern de ARN pequeño. El transporte de los ARNs de interferencia al floema se confirma mediante la reducción significativa en el desarrollo de *Myzus persicae* que se alimentan en las plantas transformadas con éxito de *Arabidopsis* y de tabaco. El análisis de transferencia Northern confirma la presencia de las moléculas de ARN de la invención en la savia del floema de las plantas que se transforman con éxito.

45 Por tanto, los insectos chupadores de savia de las plantas pueden ser controlados ahora usando secuencias de dsRNA específicas y selectivas que seleccionan como dianas genes esenciales de insectos chupadores de savia de las plantas, para minimizar el aumento de población de áfidos en plantas de cosechas.

Referencias citadas

- Adams y Sekelsky (2002) Nature Reviews Genetics 3:189.
- Almon *et al.* (1997) Plant Physiol. 115:1599-1607.
- An *et al.* (1996) The Plant J. 10, 107.
- 50 Ashford *et al.* (2000) J. Ins. Physiol. 46:335-341.

- Bender *et al.* (1997) *Cell*. 91:777-88.
- Brears *et al.* (1991) *Plant J.* 1:235-244.
- Ceci *et al.* (2003) *The Plant J.* 33:557-566.
- Christensen *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18, 675-689.
- 5 Christou *et al.* (1990) *Trends Biotechnology* 8, 145.
- Clarkson y Saint (1999) *DNA Cell. Biol.* 18:457-62.
- Clarkson *et al.* (1999) *Nature* 399:694-7.
- Comejo *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 23, 567-581.
- Cristofolletti *et al.* (2003) *J. Ins. Physiol.* 49:11-24.
- 10 Datta *et al.* (1990) *Bio/Technology* 8, 736-740
- Dehio *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 23:1199-1210.
- de Pater *et al.* (1992) *The Plant J.* 2, 834-844.
- Depicker *et al.* (1982) *J. Molec. Appl. Genetics* 1, 561-573.
- Devereux J, *et al.* (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:387-395.
- 15 Down *et al.* (1996) *J. Insect Physiol.* 42:1035-1045.
- Dubreuil y Wang (2000) *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21:705-13.
- Edwards *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3459-3463.
- Foissac *et al.* (2002) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:967-978.
- Franck *et al.* (1980) *Cell* 21, 285-294
- 20 Fromm *et al.* (1990) *Bio/Technology* 8, 833-839
- Funk *et al.* (2002) *Plant Physiol.* 128:84-94.
- Fyrberg *et al.* (1998). *Biochem. Genet.* 36:299-310
- Gardner *et al.* (1981) *Nucleic Acids Research* 9, 2871-2887
- Gielen *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:835-845
- 25 Gordon-Kamm *et al.* (1990) *The Plant Cell* 2, 603-618
- Graham *et al.* (1997). *Plant Mol. Biol.* 33:729-735.
- Guivarc'h *et al.* (1996). *Transgenic research* 5:3-11.
- Gura (2003) *Nature* 404:804-808.
- Hay (2000) *Cell. Death Differ.* 7:1045-56.
- 30 Hedley *et al.* (2000) *J. Exp. Botany* 51:817-821.
- Hehn y Rohde (1998). *J. Gen. Virol.* 79:1495-1499.
- Henrich *et al.* (2000) *Genesis* 28:125-33.
- Hinchee *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6, 915.
- Hovemann *et al.* (1988) *Nucl. Acids Res.* 16:3175-94.
- 35 Hull y Howell (1987) *Virology* 86, 482-493.

- Ito *et al.* (2000) *Plant Science* 155:85-100.
- Jarver y Langel (2004) *Drug Discovery Today* 9:395-402.
- Jiang *et al.* (2000). *Dev. Biol.* 226:118-36.
- Johnson *et al.* (1998) *Gene* 221:127-34.
- 5 Kertbundit *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5212-5216.
- Kiyokawa *et al.* (1994) *Plant Physiology* 104:801-802.
- Korber *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:3983-91.
- Kuhn *et al.* (1997) *Science* 275:1298-1300.
- Lam y Thummel (2000) *Curr. Biol.* 10:957-63.
- 10 Last *et al.* (1990) *Theor. Appl. Genet.* 81, 581-588.
- Leyva *et al.* (1992) *Plant Cell.* 4:263-271.
- Magrelli *et al.* (1994) *Science* 266:1986-1988.
- Margolis y Duyk (1998) *Nature Biotech.* 16:311.
- Marzoui *et al.* (1999) *RNA* 5:1615-31.
- 15 Matthews y Kaufman (1987) *Dev. Biol.* 119:100-114
- Medberry *et al.* (1992) *Plant Cell* 4:185-192.
- Moran y Thompson (2001) *Plant Physiol.* 125:1074-1085.
- Mottus *et al.* (2000) *Genetics* 154:657-68.
- Myrick y Dearolf (2000) *Gene* 244:119-125.
- 20 Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-53.
- Newmark *et al.* (2003) *P.N.A.S. USA* 100, supl. 1, 11861-11865.
- Nolte y Koch (1993) *Plant Physiol.* 101:899-905.
- Pandolfini *et al.* (2003) *BioMedCentral (BMC) Biotechnology* 3:7 (<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/3/7>)
- Pathirana *et al.* (1997). *Plant J.* 12:293-304.
- 25 Rahbe *et al.* (1995) *Entomologia Experimentalis et Applicata* 76:143-155.
- Rajagopal *et al.* (2002). *J. Biol. Chem.* 277:46849-46851.
- Ramloch-Lorenz *et al.* (1993). *The Plant J.* 4:545-554.
- Rao *et al.* (1998) *The Plant Journal* 15:469-477.
- Rohde *et al.* (1994) *Plant Mol. Biol.* 27:623-628.
- 30 Rossi *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9750-9754.
- Roy *et al.* (2002) *J. Agric. Food Chem.* 50:6775-9.
- Schunmann *et al.* (2003) *Plant Functional Biology* 30:453-460.
- Shi *et al.* (1994) *J. Exp. Bot.* 45:623-631.
- Shigenobu *et al.* (2000) *Nature* 407:81-86.
- 35 Shimamoto *et al.* (1989) *Nature* 338, 274-276.

- Smith *et al.* (2000) *Nature* 407:319-20.
- Spena y Langenkemper (1997) *Genet. Res.* 69:11-15.
- Spradling *et al.* (1999) *Genetics* 153:135-177.
- Stoger *et al.* (1999) *Molecular Breeding* 5:65-73.
- 5 Thompson *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Timmons *et al.* (2001) *Gene* 263, 103-112.
- Timmons y Fire (1998) *Nature* 395:854.
- Tornero *et al.* (1996) *Plant J.* 9:639-648.
- Torres-Schumann *et al.* (1996) *Plant J.* 9:283-96.
- 10 Tortiglione *et al.* (2003) *Plant Mol Biol.* 53(6):891-902.
- Unnamalai *et al.* (2004) *FEBS Letters* 566:307-310.
- van Daal y Elgin (1992) *Mol Biol Cell* 3:593-602.
- Velten y Schell (1985) *Nucleic Acids Research* 13, 6981-6998 (1985)
- Velten *et al.* (1984) *EMBO J* 3, 2723-2730 (1984).
- 15 Verdaguer *et al.* (1998) *Plant Mol. Biol.* 37, 1055-1067 (1998).
- Wu *et al.* (2000) *Plant J.* 22:495-502.
- Yin y Beachy (1995) *Plant J.* 7:969-980.
- Yin *et al.* (1997) *Plant J.* 12:1179-88.
- Yingqiu *et al.* (2000) *Science in China (Series C)* vol. 43:498-506.
- 20 Yoshimoto *et al.* (2003) *Plant Physiol.* 131:1511-1517.
- Zeremski *et al.* (2003) *Genesis* 35:31-38.
- Zhang *et al.* (1991) *The Plant Cell* 3, 1155-1165.
- Zhang *et al.* (1996) *Plant Physiol.* 112:1111-1117.
- Zhou *et al.* (1998) *Chin. J. Biotechnol.* 14:9-16.
- 25 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> Commonwealth scientific and Industrial Research Organisation
- Bayer Bioscience NV
- Waterhouse, Peter
- Whyard, Steven
- 30 Van Rie, Jeroen
- <120> Resistencia a los insectos usando inhibición de la expresión génica
- <130> BCS03-2008 w01
- <150> US 60/520.306
- <151> 17/11/2003
- 35 <160> 12

<170> PatentIn version 3.0
 <210> 1
 <211> 27
 <212> ADN
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador degenerado diseñado
 <400> 1
 aaaacagaag aagaggtaaa aaygara 27
 10 <210>2
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> cebador degenerado diseñado
 <220>
 <221> característica diversa
 <223> n en 20 es c, g, a o t
 <400> 2
 20 ggtttctggc ttcgtctggn gtrtaytt 28
 <210>3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> cebador degenerado diseñado
 <400> 3
 tacaactcsa tcytgaccac 20
 <210>4
 30 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador degenerado diseñado
 35 <400> 4

ES 2 374 529 T3

tccatrcct cwccbacrta cc 22

<210>5

<211>279

<212> ADN

5 <213> Aphis gossypii

<400> 5

```

aaaacagaag aagaggtaaa aatgagaatg aaacagaaaa gcgtgagttg gtgttcaaag 60
aagatggaca agaatatgct caagttacca aaatgttggg aaatggacgt ctagaagcaa 120
tgtgttttga tgggtgaaga cgactttgct acattcgagg aaaacttagg aaaaagggtg 180
ggatcaatca agctgacata gtattgatag gcttacgtga atatcaagat acaaaagccg 240
atgtaatttt gaaatacacc ccagacgaag ccagaaacc 279

```

<210> 6

<211> 279

10 <212> ADN

<213> Myzus persicae

<400>6

```

aaaacagaag aagaggtaaa aacgaaaatg aaaccgagaa gcgtgaattg gtgttcaaag 60
aagatggcca agaatatgct caagttacca aaatgttggg aaatggacgt ctagaagcta 120
tgtgctttga tgggtgtaaa cgactttgcc acatacgagg aaaacttagg aaaaagggtat 180
ggattaatca agctgatata gtattaatag gtttacgtga ataccaagac acaaaagccg 240
atgtaatttt gaaatacaca ccagacgaag ccagaaacc 279

```

<210> 7

15 <211> 638

<212> ADN

<213> Aphis gossypii

<220>

<221> característica diversa

20 <223> n en 591, 592 y 637 es a, c, g o ó t

<400> 7

tcatggctgg actacgagggc catctacgac atctgccc gccaacctgga catcgagcgg 60
 cccacgtaca cgaacctcaa ccggctgac gggcagatcg tgctgttccc atcacgggcg 120
 tcgctgcggt tcgacggcgc gctgaacgtc gacctgaccg agttccagac gaacctggtg 180
 ccgtaccgcg gcattcactt cccgctggcc acgtacgcgc cggtcataatc ggccgagaag 240

gcgtaccacg agcagctgtc cgtggccgaa atcaacccaa cgcgtgcttc gaaccggcca 300
 aaccagaatg ggtcaagatg cgacccgcgg cacggcaagt acatgggcct gctgcaatgc 360
 tgtaaccgcg gcgacgtcgt gcccaaggac atgaacgcgg ccatcgccac catcaagacc 420
 aagaggacca tcgtgtacgt cgactgggtc ccgaccgggt tcaagggtggg catctactac 480
 cagccgccga ccgtggtgcc gggggcgatc tggccaagggt gcagcgggcg gtgtgcatgt 540
 tgtccaacac gacggccatc tccgaggcgt gggcccggct cgaccacaag nntgacctga 600
 tgtacgtga cacgcgcgtc cgtccactgg tacgtang 638

<210>8

<211>628

5 <212> ADN

<213> Myzus persicae

<220>

<221> característica diversa

<223> n en 3, 113, 128, 137, 509, 615, 617, y 627 es a, c, g, o t

10 <400>8

tgnacacagt gactgtgcat tcatggtcga taatgaagcc atctatgaca tctgccgtcg 60
 taatctcgat attgaacgtg cccacttaca ctaacttgaa tcgtcttatt ggncagattg 120
 tgtcttcat cacagctct ctccgtttcg atggtgccct caatggtgac ttgactgaat 180
 tccagaccaa tttggtecca taccctcgta ttcatttccc attggtcact tatgcaccag 240
 tcatctccgc tgaaaaggct taccatgaac aattgtccgt atcagaaatc actaacgctt 300
 gttttgaacc agccaaccaa atggtgaaat gtgatccacg tcatggcaaa tacatggctt 360
 gttgcatggt gtaccgtggt gatgtgtgac ccaaagacgt caacgctgcc attgcttcca 420
 tcaagaccaa gagaacattc agtttggtga ctggtgtcca actggttca aagttgggta 480
 tcaactacca accccaacc gtggtaccng gtgtgacttg gtctaaagta caacgtgctg 540
 tctgcatggt gtccaacact acagctattg ctgaagcttg ggtctagggt tggtaccaca 600
 agttcgtaac ttgcnantac gtccacna 628

<210> 9

<211> 30

<212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador degenerado diseñado
 5 <400> 9
 cccaagcttt gcttgggtg tgccgaccgg 30
 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 10 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador degenerado diseñado
 <400> 10
 cccaagctta tcttgaaat agacaagtcg 30
 15 <210> 11
 <211>408
 <212> ADN
 <213> Myzus persicae
 <400> 11
tcgtccggtt accattacaa cgctctcaca tgcgaaggat gcaaggggtt cttccggagg 60
agcatcacca agaacgccgt gtaccagtgc aagtacggca acaattgcga aatcgacatg 120
tacatgaggc ggaagtgccca ggagtgccgg ctgaaaaaat gcctgaccgt cggcatgagg 180
cctgaartgtg ttgtacctga agttcaatgc gcagtaaaaa gaaaggagaa aaaagctcaa 240
cgagaaaaag ataaaccaa ttctactaca gacatttctc ctgaaataat aaaaatagaa 300
cctacagaga tgaagattga atgtggtgaa ccaatgataa tgggcacacc tatgccgact 360
gtaccttacg tgaaaccttt gagttctgaa caaaaagaac tgatccac . 408
 20
 <210> 12
 <211> 1173
 <212> ADN
 <213> Myzus persicae
 25 <220>
 <221> característica diversa
 <223> n en 704 es c, g, a, o t
 <400> 12

ES 2 374 529 T3

tgccagcgca	tttgcgacca	gtgggacaga	ttaggtagct	tgacacagaa	acggagaact	60
gacttggatg	atgcagaaaa	aatattagag	aaaattgata	tattgcattt	ggaattcgct	120
aagagagcag	ctcctttcaa	caactggttg	gatggtacac	gtgaagattt	agtggacatg	180
ttcattgtac	acactgttga	ggaaatccaa	ggattgattg	atgcacatgg	acaatttaag	240
gctactttgt	ctgatgctga	caaagagtac	aactctatca	tggactggt	caaagatgtt	300
gagtcaactg	tacaaaaata	ccaatacct	ggtggtcttc	agaaccgta	cactactttg	360
acttctagtg	atttaagcaa	aaaatggtct	gaagtgaaac	atttagtgcc	caaagagac	420
acgaccctcc	aagctgaact	cagaaaacaa	caaaacaatg	agatgctacg	tctgcaattt	480
gcggaagaag	caaatcaagt	gggtccttgg	attgagaggc	aatggacgc	tgtcacggcc	540
atcggtatgg	gattgcaggt	tctctggaag	atcaattgca	ccaactgaaa	caatttaggg	600
ctactttgtc	tgatgctgac	aagagtacaa	ctctatcatt	ggactggtca	agatgttgag	660
tcaactgtac	aaaaatacca	aatacctggt	ggtcttcaga	accngtacac	tactttgact	720
tctagtgatt	taagcaaaaa	atggtctgaa	gtgaaacatt	tagtgcccca	aagagacacg	780
acctccaag	ctgaactcag	aaaacaacaa	aacaatgaga	tgctacgctg	tcaatttgcg	840
gagaagtcaa	atcaagtggg	tccttggatt	gagaggcaaa	tggacgctgt	cacggccatc	900
ggtatgggat	tgcaaggttc	tctggaagat	caattgcacc	aactgaaaca	atacgaacag	960
aatgtgtttg	catacaagcc	acatattgag	gaattagaga	aatccacca	agctgtacaa	1020
gagggtatga	tcttcgaaaa	caggtatact	caatacacia	tggagacatt	acgtgttggg	1080
tgggaacaac	tattgacgtc	cataaatcgc	aatgtgaatg	aagtagaaaa	ccaatattg	1140
accagagact	ccaagggcat	caccaggag	cag			1173

REIVINDICACIONES

1. Un método para silenciar un gen de un insecto chupador de savia de las plantas, que comprende aplicar a la dieta o al alimento de dicho insecto chupador de savia de las plantas dsRNA o siRNA sin agentes promotores de la transfección, dsRNA o siRNA el cual se dirige a un gen esencial de un insecto chupador de savia de las plantas.
- 5 2. Un método para identificar la función génica en un insecto chupador de savia de las plantas, que comprende la etapa de aplicar dsRNA o siRNA, que selecciona como diana un gen de insecto chupador de savia de las plantas, a la dieta de dicho insecto, y evaluar cambios fenotípicos o bioquímicos en dicho insecto, en el que dicho dsRNA o siRNA se aplica sin agentes promotores de la transfección.
- 10 3. Un método para identificar nuevas dianas para compuestos insecticidas, que comprende las etapas de: a) aplicar dsRNA o siRNA sin agentes promotores de la transfección al alimento o dieta de un insecto chupador de savia de las plantas; b) analizar qué genes, cuando se silencian, confieren letalidad a dicho insecto, c) clonar y caracterizar dichos genes así analizados; d) identificar compuestos que destruyen o inactivan dicho gen o el ARN o proteína codificado de ese modo; y e) poner en contacto dichos compuestos con dicho insecto o alimento o dieta de dicho insecto para confirmar la naturaleza plaguicida de dicho compuesto.
- 15 4. Un método para obtener mortalidad significativa de insectos o control significativo de insectos silenciando un gen esencial de un insecto chupador de savia de las plantas mediante aplicación de dsRNA o siRNA al alimento de dicho insecto, en comparación con insectos de control alimentados en dsRNA o siRNA que selecciona como diana un gen no esencial o un gen no expresado en el insecto chupador de savia de las plantas.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4, en el que dicho gen del insecto chupador de savia es homólogo a un gen que, cuando se silencia parcial o completamente en un insecto tal como *Drosophila*, da como resultado un mutante con un fenotipo letal, y en el que 2 genes son homólogos cuando son similares en secuencia en un grado tal que, cuando las dos secuencias se alinean, el número de posiciones con nucleótidos idénticos dividido entre el número de nucleótidos en la más corta de las secuencias es mayor que 70%.
- 25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4, en el que dicho gen del insecto chupador de savia es un gen cuyo silenciamiento provoca una disminución del crecimiento, del desarrollo, de la reproducción o de la supervivencia de un insecto chupador de savia de las plantas, en comparación con insectos de control alimentados en dsRNA o siRNA que selecciona como diana un gen no expresado en el insecto chupador de savia de las plantas.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 6, en el que dicho dsRNA o siRNA no silencia genes de una planta, o de animales no dianas, tales como depredadores del insecto chupador de savia de las plantas, o animales tales como reptiles, anfibios, pájaros, o mamíferos.
- 35 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 7, en el que se selecciona una porción de una secuencia diana que está presente en varios insectos chupadores de savia de las plantas de un hospedante vegetal en secuencia idéntica o con elevada identidad de secuencia, en el que una secuencia con elevada identidad de secuencia se refiere al número de posiciones con nucleótidos idénticos dividido entre el número de nucleótidos en la más corta de las secuencias, siendo mayor que 95%.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 8, en el que dicho gen del insecto chupador de savia se selecciona del grupo que consiste en: el gen del factor 1A de iniciación de la traducción eucariota (eIF1A), un gen de (alfa) tubulina, un gen de alfa-actinina, y un gen del receptor de ecdisona.
- 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 9, en el que dicho gen del insecto chupador de savia de las plantas son aquellos genes de insectos chupadores de savia de las plantas identificados usando los cebadores de una cualquiera de SEC ID NO: 1-4 y SEC ID NO: 9 y 10, o genes de insectos chupadores de savia de las plantas que corresponden a o que comprenden una cualquiera de las secuencias de SEC ID NO: 5 a 8, SEC ID NO: 11 o SEC ID NO: 12, así como genes de áfidos homólogos a las secuencias de SEC ID NO: 5 a 8, SEC ID NO: 11 o SEC ID NO: 12, en el que 2 genes son homólogos cuando son similares en secuencia en un grado tal que, cuando se alinean las dos secuencias, el número de posiciones con nucleótidos idénticos dividido entre el número de nucleótidos en la más corta de las secuencias es mayor que 70%.
- 45 11. El método de la reivindicación 10, en el que el dsRNA o siRNA selecciona como diana a la secuencia de eIF1A de *A. gossypii* SEC ID NO: 5 solamente en la porción de la posición nucleotídica 72 hasta el extremo de SEC ID NO: 5.
- 50 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 9, en el que dicho gen del insecto chupador de savia de las plantas comprende la secuencia de una cualquiera de SEC ID NO: 5 a 8, o SEC ID NO: 12.