

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 938**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2009 E 09702253 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2235182**

54 Título: **Composiciones y métodos para la supresión de polinucleótidos diana de Lepidoptera**

30 Prioridad:

17.01.2008 US 21676 P

17.01.2008 US 21699 P

09.01.2009 US 351267

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

18.11.2013

73 Titular/es:

PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL INC. (50.0%)

7100 N.W. 62nd Avenue

Johnston, IA 50131-1014, US y

**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(50.0%)**

72 Inventor/es:

HERRMANN, RAFAEL;

LASSNER, MICHAEL;

LU, ALBERT L.;

NELSON, MARK;

PRESNAIL, JAMES K. y

RICE, JANET A.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 429 938 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

Composiciones y métodos para la supresión de polinucleótidos diana de Lepidoptera

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a métodos de la biología molecular y al silenciamiento génico para el control de plagas

Antecedentes de la invención

Las plagas de insectos son un grave problema en la agricultura. Destruyen millones de hectáreas de cultivos básicos tales como maíz, habas de soja, guisantes, y algodón. Anualmente, estas plagas causan más de 100.000 millones de dólares en daños a los cultivos solamente en los Estados Unidos. En una batalla estacional en curso, los granjeros deben aplicar miles de millones de litros de plaguicidas sintéticos para combatir estas plagas. Otros métodos empleados en el pasado liberaron actividad insecticida por medio de microorganismos o genes derivados de microorganismos expresados en plantas transgénicas. Por ejemplo, se sabe que ciertas especies de microorganismos del género *Bacillus* poseen actividad plaguicida contra una amplia gama de plagas de insectos incluyendo *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera*, y otras. De hecho, los plaguicidas microbianos, concretamente aquellos obtenidos de cepas de *Bacillus*, han jugado un importante papel en la agricultura como alternativas para el control químico de plagas. Los científicos agrícolas han desarrollado plantas de cultivo con una resistencia a los insectos incrementada por medio del diseño genético de plantas de cultivo para producir proteínas insecticidas a partir de *Bacillus*. Por ejemplo, las plantas de maíz y algodón diseñadas genéticamente para producir toxinas Cry (véanse, p. ej., Aronson (2002) Cell Mol. Life Sci. 59(3):417-425; Schnepf et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(3):775-806) son ampliamente utilizadas en la actualidad en la agricultura Americana y han proporcionado al granjero una alternativa a los métodos de control de insectos tradicionales. No obstante, estas proteínas insecticidas de *Bt* solamente protegen a las plantas de una gama relativamente reducida de plagas. Por otra parte, estos modos de actividad insecticida proporcionaron niveles variables de especificidad y, en algunos casos, ocasionaron consecuencias medioambientales significativas. De este modo, existe una necesidad inmediata de métodos alternativos para el control de plagas.

Breve resumen de la invención

Se proporcionan métodos y composiciones que emplean un elemento silenciador que, cuando es ingerido por una plaga, tal como una plaga del orden Lepidoptera, es capaz de disminuir la expresión de una secuencia diana en la plaga. En realizaciones específicas, la disminución de la expresión de la secuencia diana controla la plaga y de ese modo los métodos y las composiciones son capaces de limitar el daño a una planta. La presente invención se refiere a diferentes polinucleótidos diana que codifican polipéptidos de familias específicas como las descritas en alguna parte de la presente memoria y diferentes polinucleótidos diana expuestos en el SEQ ID NO: 1, o variantes o fragmentos activos del mismo, en donde una disminución en la expresión de una o más de las secuencias en la plaga diana controla la plaga (esto es, tiene actividad insecticida). Los elementos silenciadores, cuando son ingeridos por la plaga, disminuyen el nivel de expresión de uno o más de los polinucleótidos diana. El elemento silenciador comprende al menos 20, o 22 nucleótidos consecutivos del SEQ ID NO: 1. En realizaciones específicas, la plaga que es controlada es *Spodoptera frugiperda*. También se proporcionan plantas, partes de plantas, células vegetales, bacterias y otras células anfitrionas que comprenden los elementos silenciadores o una variante o un fragmento activos del mismo.

Por consiguiente, la invención proporciona una célula vegetal que tiene incorporado establemente a su genoma un polinucleótido heterólogo que comprende un elemento silenciador conectado operablemente a un promotor activo en dicha célula vegetal, en donde dicho elemento silenciador comprende un fragmento de al menos 20 nucleótidos consecutivos del SEQ ID NO: 1,

en donde dicho elemento silenciador, cuando es ingerido por una plaga del orden Lepidoptera, reduce el nivel de una secuencia diana en dicha plaga a menos de 95% del nivel de la secuencia diana en una plaga de control que no ha ingerido el elemento silenciador y de ese modo controla la plaga del orden Lepidoptera.

En otra realización, se proporciona un método para el control de plagas, tal como una plaga del orden Lepidoptera. El método comprende alimentar a una plaga con una composición que comprende un elemento silenciador, en donde el elemento silenciador, cuando es ingerido por la plaga, reduce el nivel de una secuencia diana en la plaga y de ese modo controla la plaga. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para controlar Lepidópteros que comprende alimentar a un Lepidóptero con una composición que comprende un elemento silenciador, en donde dicho elemento silenciador, cuando es ingerido por dichos Lepidópteros, reduce el nivel de una secuencia diana de Lepidópteros a menos de 95% del nivel de la secuencia diana en una plaga de control que no ha ingerido el elemento silenciador y de ese modo controla los Lepidópteros y dicho elemento silenciador comprende un fragmento de al menos 20 nucleótidos consecutivos del SEQ ID NO: 1.

Los métodos para proteger a una planta de una plaga comprenden la introducción en la planta o parte de la planta de un elemento silenciador. Cuando la planta que expresa el elemento silenciador es ingerida por la plaga, el nivel de la secuencia diana disminuye y la plaga se controla.

Descripción detallada de la invención

- 5 A continuación se describirán las presentes invenciones más completamente con referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran algunas, pero no todas las realizaciones de las invenciones. En efecto, estas invenciones se pueden plasmar en muchas formas diferentes y no se deben considerar limitadas a las realizaciones mostradas en la presente memoria; en lugar de eso, estas realizaciones se proporcionan de manera que esta descripción satisfaga los requerimientos legales aplicables. Los números similares hacen referencia a elementos completamente similares.
- 10 Muchas modificaciones y otras realizaciones de las invenciones mostradas en la presente memoria acudirán a la mente de los expertos en la técnica a la cual pertenecen estas invenciones que tienen la ventaja de las ilustraciones presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos asociados. Por lo tanto, se debe entender que las invenciones no están limitadas a las realizaciones específicas descritas y que las modificaciones y otras realizaciones están destinadas a estar incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Aunque en la presente memoria se emplean términos específicos, estos se utilizan en un sentido genérico y descriptivo solamente y no con el propósito de limitar.
- 15

I. Visión general

Se proporcionan métodos y composiciones que emplean un elemento silenciador que, cuando es ingerido por una plaga, tal como una plaga del orden Lepidoptera, es capaz de disminuir la expresión de una secuencia diana en la plaga. En realizaciones específicas, la disminución de la expresión de la secuencia diana controla la plaga y de ese modo los métodos y las composiciones son capaces de limitar el daño de una planta o parte de una planta. La presente invención proporciona polinucleótidos diana que codifican polipéptidos de hormonas juveniles. El polinucleótido diana se expone en el SEQ ID NO: 1 o variantes y fragmentos activos del mismo. Los elementos silenciadores se diseñan a la vista de estos polinucleótidos diana descritos que, cuando son ingeridos por la plaga, disminuyen la expresión de una o más de las secuencias diana y de ese modo controlan la plaga (esto es, tiene actividad insecticida). Véanse, por ejemplo, los SEQ ID NO: 51-59.

20

25

Según se utiliza en la presente memoria, por "controlar una plaga" o "controla una plaga" se entiende cualquier efecto sobre una plaga que da como resultado la limitación del daño que ocasiona la plaga. Controlar una plaga incluye, pero no está limitado a, eliminar la plaga, inhibir el desarrollo de la plaga, alterar la fertilidad o el crecimiento de la plaga de tal manera que la plaga proporcione menos daño a la planta, disminuir el número de vástagos producidos, producir plagas menos activas, producir plagas más susceptibles del ataque de un depredador, o disuadir a las plagas de ingerir la planta.

30

Por "resistencia a una enfermedad" se entiende que las plantas evitan los síntomas de la enfermedad que son el resultado de las interacciones entre planta y patógeno. Esto es, se evita que los patógenos ocasionen enfermedades de plantas y los síntomas asociados con la enfermedad, o alternativamente, los síntomas de la enfermedad causados por el patógeno se minimizan o disminuyen.

35

La reducción del nivel de expresión del polinucleótido diana o del polipéptido codificado por el mismo, en la plaga da como resultado la supresión, el control, y/o la eliminación del organismo patogénico invasor. La reducción del nivel de expresión de la secuencia diana de la plaga reducirá los síntomas de enfermedad resultantes de la sensibilización con el patógeno de al menos aproximadamente 2% a al menos aproximadamente 6%, de al menos aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, de al menos aproximadamente 10% a aproximadamente 60%, de al menos aproximadamente 30% a aproximadamente 70%, de al menos aproximadamente 40% a aproximadamente 80%, o de al menos aproximadamente 50% a aproximadamente 90% o más. Por tanto, los métodos de la invención se pueden utilizar para proteger a las plantas de enfermedades, concretamente de aquellas enfermedades que están causadas por plagas del orden Lepidoptera.

40

45

Los análisis que miden el control de una plaga son comúnmente conocidos en la técnica, como lo son los métodos para cuantificar la resistencia a las enfermedades en las plantas después de la infección por patógenos. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.614.395. Tales técnicas incluyen, la medición a lo largo del tiempo, el diámetro medio de la lesión, la biomasa de patógeno, y el porcentaje total de tejidos de la planta deteriorados. Véase, por ejemplo, Thomma et al. (1998) Plant Biology 95:15107-15111. Véanse, también los ejemplos de más abajo.

50

La invención se refiere a composiciones y métodos para proteger a las plantas de las plagas vegetales, tales como las plagas del orden Lepidoptera o inducir resistencia en la planta a una plaga vegetal, tales como las plagas del orden Lepidoptera. Las orugas y las formas relacionadas de los insectos lepidópteros comprenden un grupo importante de plagas agrícolas que se alimentan de plantas, especialmente durante la fase de crecimiento de larva. Los métodos de alimentación de las larvas de Lepidoptera incluyen típicamente el masticado de plantas o partes de plantas. Según se utiliza en la presente memoria, el término "Lepidoptera" se emplea para hacer referencia a cualquier miembro del orden Lepidoptera. En realizaciones concretas, las composiciones y los métodos de la

55

invención controlan las larvas de Lepidoptera (es decir, orugas). Por consiguiente, las composiciones y los métodos también son útiles en la protección de las plantas contra cualquier Lepidóptero incluyendo, por ejemplo, *Pieris rapae*, *Pectinophora gossypiella*, *Synanthedon exitiosa*, *Melittia cucurbitae*, *Cydia pomonella*, *Grapholita molesta*, *Ostrinia nubilalis*, *Pladia interpunctella*, *Galleria mellonella*, *Manduca sexta*, *Manduca quinquemaculata*, *Lymantria dispar*,
 5 *Euproctis chrysorrhoea*, *Trichoplusia ni*, *Mamestra brassicae*, *Agrotis ipsilon*, *Plutella maculipennis*, *Anticarsia gemmatilis*, *Pseudaletia unipuncta*, *Epinotia abnormis*, *Heliothis virescens*, *Heliothis zea*, *Spodoptera frugiperda*, *Scirpophaga nigrifluella*, *Sesamia inferens*, *Buseola fusca*, *Cnaphalocrocis medinalis*, *Chilo suppressalis*, o *Spodoptera littoralis*. En realizaciones concretas, los métodos controlan *Spodoptera frugiperda*.

II. Secuencias diana

10 Según se utiliza en la presente memoria, una "secuencia diana" o "polinucleótido diana" comprende cualquier secuencia de la plaga cuyo nivel de expresión se desea reducir. En realizaciones específicas, la disminución del nivel de la secuencia diana en la plaga controla la plaga. Por ejemplo, la secuencia diana puede ser esencial para el crecimiento y desarrollo. Si bien la secuencia diana puede ser expresada en cualquier tejido de la plaga, en
 15 realizaciones específicas de la invención, las secuencias elegidas como diana para la supresión en la plaga son expresadas en células del tejido intestinal de la plaga, células del intestino medio de la plaga, y células que revisten el lumen intestinal o el intestino medio. Tales secuencias diana pueden estar implicadas en el metabolismo, el crecimiento o la diferenciación de las células intestinales.

En una realización de la invención la secuencia diana comprende un polipéptido que pertenece a una o más clases de enzimas tales como un polipéptido de una hormona juvenil, un polipéptido vacuolar, un polipéptido de cadherina,
 20 un polipéptido de la cutícula, un factor de iniciación de la traducción, un polipéptido SARI, un factor de elongación, un fosfoligoligósacárido, un polipéptido de miosina, un transportador de aminoácidos del canal del potasio, un rectificador de la entrada de potasio, un transportador de aminoácidos, un polipéptido de tubulina, un polipéptido de ubiquitina, y una ribonucleoproteína nuclear pequeña.

Los ejemplos no limitantes de las secuencias diana incluyen un polinucleótido mostrado en el SEQ ID NO: 1. Como se ilustra en alguna parte en la presente memoria, la disminución del nivel de expresión de estas secuencias diana o miembros de las clases de enzimas citadas en Lepidoptera controla la plaga.
 25

III. Elementos silenciadores

Por "elemento silenciador" se entiende un polinucleótido que cuando es ingerido por una plaga, es capaz de reducir o eliminar el nivel o expresión de un polinucleótido diana o el polipéptido codificado por él. El elemento silenciador
 30 empleado puede reducir o eliminar el nivel de expresión de la secuencia diana influyendo en el nivel del transcrito de ARN diana o, alternativamente, influyendo en la traducción y afectando de ese modo al nivel del polipéptido codificado. Los métodos para analizar los elementos silenciadores funcionales que son capaces de reducir o eliminar el nivel de una secuencia de interés se describen en alguna parte en la presente memoria. Un único polinucleótido empleado en los métodos de la invención puede comprender uno o más elementos silenciadores para el mismo o
 35 diferentes polinucleótidos diana.

En realizaciones específicas, la secuencia diana no es un gen endógeno de una planta. En otras realizaciones, si bien el elemento silenciador controla las plagas, preferiblemente el elemento silenciador no tiene efecto sobre la planta o parte de la planta normal.

Como se discute con mayor detalle a continuación, los elementos silenciadores pueden incluir, pero no están limitados a, un elemento de supresión efector, un elemento de supresión antisentido, un ARN de doble hebra, un miARN, o un elemento de supresión en horquilla. Los ejemplos no limitantes de los elementos silenciadores que se
 40 pueden emplear para disminuir la expresión de estas secuencias de Lepidoptera diana comprenden fragmentos y variantes de la secuencia efectora o antisentido o consisten en la secuencia efectora o antisentido de las secuencias mostradas en los SEQ ID NO: 1, 51, 54 y/o 57 o una variante o fragmento biológicamente activos de las mismas. En realizaciones específicas, el elemento silenciador comprende o consiste en al menos una de las secuencias mostradas en uno cualquiera de los SEQ ID NO: 51-69. En realizaciones adicionales, los elementos silenciadores pueden comprender al menos un residuo de timina en el extremo 3'. Esto puede ayudar a la estabilización. De este modo, los elementos silenciadores pueden tener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más residuos de timina en el extremo 3'.
 45

50 En realizaciones adicionales, el elemento silenciador comprende los SEQ ID NO: 52 y 53; 55 y 56 y/o; 58 y 59.

Por "reduce" o "que reduce" el nivel de expresión de un polinucleótido o un polipéptido codificado de ese modo se pretende representar, que el nivel de polinucleótido o polipéptido de la secuencia diana es estadísticamente menor que el nivel de polinucleótido o el nivel de polipéptido de la misma secuencia diana en una plaga de control apropiada que no está expuesta a (es decir, no ha ingerido) el elemento silenciador. En realizaciones concretas de la
 55 invención, la reducción del nivel de polinucleótido y/o el nivel de polipéptido de la secuencia diana en una plaga de acuerdo con la invención da como resultado menos de 80%, menos de 70%, menos de 60%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 10%, o menos de 5% del nivel de polinucleótido, o del nivel del polipéptido codificado de ese modo, de la misma secuencia diana en una plaga de control apropiada. Los métodos

para analizar el nivel del transcrito de ARN, el nivel del polipéptido codificado, o la actividad del polinucleótido o polipéptido se comentan en alguna parte en la presente memoria.

i. Elementos de supresión efectores

5 Según se utiliza en la presente memoria, un "elemento de supresión efector" comprende un polinucleótido diseñado para expresar una molécula de ARN que corresponde a al menos una parte de un ARN mensajero diana en la orientación "efectora". La expresión de la molécula de ARN que comprende el elemento de supresión efector reduce o elimina el nivel del polinucleótido diana o el polipéptido codificado de ese modo. El polinucleótido que comprende el elemento de supresión efector puede corresponder a toda o a una parte de la secuencia del polinucleótido diana, toda o una parte de la región no traducida 5' y/o 3' del polinucleótido diana, toda o parte de la secuencia codificante del polinucleótido diana, o toda o parte de la secuencia codificante y las regiones no traducidas del polinucleótido diana.

15 Típicamente, un elemento de supresión efector tiene una identidad sustancial con el polinucleótido diana, típicamente una identidad de secuencia mayor de aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Véanse, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.283.184 y 5.034.323. El elemento de supresión efector puede tener cualquier longitud siempre que permita la supresión de la secuencia elegida como diana. El elemento de supresión efector puede ser, por ejemplo, de 20, 22, 25, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 900 o más largo.

ii. Elementos de supresión antisentido

20 Según se utiliza en la presente memoria, un "elemento de supresión antisentido" comprende un polinucleótido que se diseña para expresar una molécula de ARN complementaria a todo o una parte de un ARN mensajero diana. La expresión del elemento de supresión de ARN antisentido reduce o elimina el nivel del polinucleótido diana. El polinucleótido para su uso en la supresión antisentido puede corresponder a todo o a parte del complemento de la secuencia que codifica el polinucleótido diana, todo o parte del complemento de la región no traducida 5' y/o 3' del polinucleótido diana, todo o parte del complemento de la secuencia codificante del polinucleótido diana, o todo o parte del complemento tanto de la secuencia codificante como de las regiones no traducidas del polinucleótido diana. Además, el elemento de supresión antisentido puede ser totalmente complementario (esto es, 100% idéntico al complemento de la secuencia diana) o parcialmente complementario (esto es, menos de 100% idéntico al complemento de la secuencia diana) al polinucleótido diana. En realizaciones específicas, el elemento de supresión antisentido comprende al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de complementariedad de secuencia con el polinucleótido diana. Se puede utilizar la supresión antisentido para inhibir la expresión de múltiples proteínas en la misma planta. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.942.657. Además, el elemento de supresión antisentido puede ser complementario a una porción del polinucleótido diana. Generalmente, se pueden utilizar secuencias de al menos 20, 22, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 450 nucleótidos o más grandes. Los métodos para la utilización de la supresión antisentido para inhibir la expresión de genes endógenos en plantas son descritos, por ejemplo, por Liu et al (2002) en *Plant Physiol.* 129:1732-1743 y en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.759.829 y 5.942.657.

iii. Elemento de supresión de ARN de doble hebra

40 Un "elemento silenciador de ARN de doble hebra" o "ARNdh" comprende al menos un transcrito que es capaz de formar un ARNdh antes o después de la ingestión por una plaga. De este modo, un "elemento silenciador de ARNdh" incluye un ARNdh, un transcrito o polirribonucleótido capaz de formar un ARNdh o más de un transcrito o polirribonucleótido capaz de formar un ARNdh. El "ARN de doble hebra" o "ARNdh" hace referencia a una estructura de polirribonucleótido formada o bien por una sola molécula de ARN auto-complementaria o bien a una estructura de polirribonucleótido formada por la expresión de al menos dos hebras de ARN distintas. La molécula o las moléculas de ARNdh empleadas en los métodos y las composiciones de la invención median la reducción de la expresión de una secuencia diana, por ejemplo, mediando la interferencia con ARN "ARNi" o el silenciamiento génico de una manera específica de la secuencia. En el contexto de la presente invención, el ARNdh es capaz de reducir o eliminar el nivel o la expresión de un polinucleótido diana o del polipéptido codificado de ese modo en una plaga.

50 El ARNdh puede reducir o eliminar el nivel de expresión de la secuencia diana influyendo en el nivel del transcrito de ARN diana, influyendo en la traducción y afectando de ese modo al nivel del polipéptido codificado, o influyendo en la expresión a nivel pre-transcripcional (esto es, a través de la modulación de la estructura de la cromatina, el patrón de metilación, etc., para alterar la expresión génica). Véanse, por ejemplo, Verdell et al. (2004) *Science* 303:672-676; Pal-Bhadra et al. (2004) *Science* 303:669-672; Allshire (2002) *Science* 297:1818-1819; Volpe et al. (2002) *Science* 297:1833-1837; Jenuwein (2002) *Science* 297:2215-2218; y Hall et al. (2002) *Science* 297:2232-2237. Los métodos para analizar los ARN de interferencia funcionales que son capaces de reducir o eliminar el nivel de una secuencia de interés se describen en alguna parte en la presente memoria. Por consiguiente, según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "ARNdh" incluya otros términos utilizados para describir moléculas de ácido nucleico que son capaces de mediar la interferencia por ARN o el silenciamiento génico, que incluyen, por ejemplo, ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN de doble hebra (ARNdh), micro-ARN (miARN), ARN en horquilla, ARN en horquilla pequeña (ARNhp), ARN de silenciamiento génico post-transcripcional (ARNsgpt), y otros.

En realizaciones específicas, al menos una hebra del dúplex o región de doble hebra del ARNdh comparte suficiente identidad de secuencia o complementariedad de secuencia con el polinucleótido diana para permitir que el ARNdh reduzca el nivel de expresión de la secuencia diana. Según se utiliza en la presente memoria, la hebra que es complementaria al polinucleótido diana es la "hebra antisentido" y la hebra homóloga al polinucleótido diana es la "hebra efectora".

En una realización, el ARNdh comprende un ARN en horquilla. Un ARN en horquilla comprende una molécula de ARN que es capaz de plegarse sobre sí misma para formar una estructura de doble hebra. Se pueden emplear estructuras múltiples como elementos en horquilla. En realizaciones específicas, el elemento de supresión de ARNdh comprende un elemento en horquilla que comprende en el siguiente orden, un primer segmento, un segundo segmento, y un tercer segmento, en donde el primer y el tercer segmentos comparten suficiente complementariedad para permitir que el ARN transcrito forme una estructura en tallo-bucle de doble hebra.

El "segundo segmento" de la horquilla comprende un "bucle" o "región en bucle". Estos términos se utilizan indistintamente en la presente memoria y se debe considerar en sentido amplio que comprenden cualquier secuencia de nucleótidos que confiere suficiente flexibilidad para permitir el auto-emparejamiento entre regiones complementarias de un polinucleótido (esto es, los segmentos 1 y 3 que forman el tallo de la horquilla). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la región en bucle puede ser sustancialmente de hebra sencilla y actuar como un espaciador entre las regiones auto-complementarias del tallo-bucle de la horquilla. En algunas realizaciones, la región en bucle puede comprender una secuencia de nucleótidos al azar o sin sentido y de ese modo no compartir identidad de secuencia con un polinucleótido diana. En otras realizaciones, la región en bucle comprende una secuencia de ARN efectora o antisentido o un fragmento de la misma que comparte identidad con un polinucleótido diana. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional Núm. WO 02/00904. En realizaciones específicas, la región en bucle se puede optimizar para que sea tan corta como sea posible siempre que todavía proporcione suficiente flexibilidad intramolecular para permitir la formación de la región del tallo con bases emparejadas. Por consiguiente, la secuencia en bucle tiene generalmente menos de 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 25, 20, 15, 10 nucleótidos o menos.

El "primer" y el "tercer" segmentos de la molécula de ARN en horquilla comprenden el tallo con bases emparejadas de la estructura en horquilla. El primer y el tercer segmentos son repeticiones invertidas la una de la otra y comparten suficiente complementariedad para permitir la formación de la región del tallo con bases emparejadas. En realizaciones específicas, el primer y el tercer segmentos son totalmente complementarios entre sí. Alternativamente, el primer y el tercer segmentos pueden ser parcialmente complementarios entre sí siempre que sean capaces de hibridar el uno con el otro para formar una región de tallo con las bases emparejadas. La cantidad de complementariedad entre el primer y el tercer segmentos se puede calcular como un porcentaje del segmento completo. De este modo, el primer y el tercer segmentos del ARN en horquilla comparten generalmente al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hasta e incluyendo el 100% de complementariedad.

El primer y el tercer segmentos tienen al menos aproximadamente 1000, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 25, 22, 20, 15 o 10 nucleótidos de longitud. En realizaciones específicas, la longitud del primer y/o el tercer segmentos es de aproximadamente 10-100 nucleótidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 75 nucleótidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 nucleótidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 nucleótidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 nucleótidos. En otras realizaciones, la longitud del primer y/o el tercer segmentos comprende al menos 10-20 nucleótidos, 20-35 nucleótidos, 30-45 nucleótidos, 40-50 nucleótidos, 50-100 nucleótidos, o 100-300 nucleótidos. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Núm. WO 0200904. En realizaciones específicas, el primer y el tercer segmentos comprenden al menos 20 nucleótidos que tienen al menos una complementariedad de 85% con el primer segmento. En otras realizaciones más, el primer y el tercer segmentos que forman la estructura de tallo-bucle de la horquilla comprenden regiones salientes 3' o 5' que tienen residuos de nucleótidos desemparejados.

En realizaciones específicas, las secuencias utilizadas en el primer, el segundo, y/o el tercer segmentos comprenden dominios que se diseñan para que tengan una identidad de secuencia suficiente con un polinucleótido diana de interés y de ese modo tengan la capacidad de disminuir el nivel de expresión del polinucleótido diana. La especificidad de los transcritos de ARN inhibidores es conferida por lo tanto generalmente por estos dominios del elemento silenciador. De este modo, en algunas realizaciones de la invención, el primer, el segundo y/o el tercer segmentos del elemento silenciador comprenden un dominio que tiene al menos 10, al menos 15, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 500, al menos 1000, o more de 1000 nucleótidos que comparten suficiente identidad de secuencia con el polinucleótido diana para permitir un descenso en los niveles de expresión del polinucleótido diana cuando se expresan en una célula apropiada. En otras realizaciones, el dominio tiene entre aproximadamente 15 y 50 nucleótidos, aproximadamente 20-35 nucleótidos, aproximadamente 25-50 nucleótidos, aproximadamente 20 y 75 nucleótidos, aproximadamente 40-90 nucleótidos aproximadamente 15-100 nucleótidos.

En realizaciones específicas, el dominio del primer, el segundo, y/o el tercer segmentos tiene un 100% de identidad de secuencia con el polinucleótido diana. En otras realizaciones, el dominio del primer, el segundo y/o el tercer segmentos que tiene homología con el polipéptido diana tienen al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más identidad de secuencia con una región del polinucleótido diana.

5 La identidad de secuencia de los dominios del primer, el segundo y/o el tercer segmentos con el polinucleótido diana solo necesita ser suficiente para disminuir la expresión del polinucleótido diana de interés. Véanse, por ejemplo, Chuang y Meyerowitz (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4985-4990; Stoutjesdijk et al. (2002) Plant Physiol. 129:1723-1731; Waterhouse y Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 4:29-38; Pandolfini et al. BMC Biotechnology 3:7, y

10 140 han descrito un análisis transitorio para determinar la eficacia de constructos de ARNh para silenciar la expresión génica *in vivo*.

La cantidad de complementariedad compartida entre el primer, el segundo, y/o el tercer segmentos y el polinucleótido diana o la cantidad de complementariedad compartida entre el primer segmento y el tercer segmento (esto es, el tallo de la estructura en horquilla) pueden variar dependiendo del organismo en el cual se va a controlar

15 la expresión génica. Algunos organismos o tipos de células pueden requerir un emparejamiento exacto o una identidad del 100%, mientras otros organismos o tipos de células pueden tolerar cierto emparejamiento erróneo. En algunas células, por ejemplo, un emparejamiento erróneo de un único nucleótido en la secuencia de redireccionamiento anula la capacidad para suprimir la expresión génica. En estas células, se pueden utilizar las casetes de supresión de la invención para dirigir la supresión de genes mutantes, por ejemplo, oncogenes cuyos

20 transcritos comprenden mutaciones puntuales y por lo tanto pueden ser dirigidos específicamente utilizando los métodos y las composiciones de la invención sin alterar la expresión del alelo de tipo salvaje restante.

Se puede utilizar cualquier región del polinucleótido diana para diseñar el dominio del elemento silenciador que comparte suficiente identidad de secuencia para permitir la expresión del transcrito en horquilla para disminuir el nivel del polinucleótido diana. Por ejemplo, el dominio puede ser diseñado para compartir identidad de secuencia con la región no traducida 5' del polinucleótido o los polinucleótidos diana, la región no traducida 3' del polinucleótido o los polinucleótidos diana, regiones exónicas del polinucleótido o los polinucleótidos diana, regiones intrónicas del polinucleótido o los polinucleótidos diana, y cualquier combinación de los mismos. En realizaciones específicas un dominio del elemento silenciador comparte suficiente homología con al menos aproximadamente 20, 22, 25 o 30 nucleótidos consecutivos de aproximadamente 1-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400,

25 400-450, 450-500, 550-600, 600-650, 650-700, 750-800, 850-900, 950-1000, 1000-1050, 1050-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400, 1400-1500, 1500-1600, 1600-1700, 1700-1800, 1800-1900, 1900-2000 nucleótidos de la secuencia diana. En algunos casos para optimizar las secuencias de ARNip empleadas en la horquilla, se puede utilizar el método del oligodesoxirribonucleótido sintético/ARNasa H para determinar sitios sobre el ARNm diana que estén en una conformación que sea susceptible de silenciamiento por ARN. Véanse, por ejemplo, Vickers et al.

30 (2003) J. Biol. Chem 278:7108-7118 y Yang et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:9442-9447. Estos estudios indican que existe una correlación significativa entre los sitios sensibles a la ARNasa H y los sitios que promueven la degradación del ARN dirigida por ARNip eficaz.

El elemento silenciador en horquilla también se puede diseñar de manera que la secuencia efectora o la secuencia antisentido no se correspondan con un polinucleótido diana. En esta realización, la secuencia efectora y antisentido flanquean una secuencia bucle que comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a todo o una parte del polinucleótido diana. De este modo, es la región en bucle la que determina la especificidad de la interferencia por ARN. Véase, por ejemplo, el documento WO 02/00904.

40

En realizaciones específicas, el elemento silenciador que comprende la horquilla comprende secuencias seleccionadas entre los SEQ ID NO: 52 y 53; 55 y 56; y/o 58 y 59;

45 Además, el silenciamiento génico transcripcional (SGT) se puede completar por medio del uso de un elemento de supresión en horquilla donde la repetición invertida de la horquilla comparte identidad de secuencia con la región promotora de un polinucleótido diana que se va a silenciar. Véanse, por ejemplo, Aufsatz et al. (2002) PNAS 99 (Supl. 4):16499-16506 y Mette et al. (2000) EMBO J 19(19):5194-5201.

En otras realizaciones, el ARNd puede comprender un ARN pequeño (ARNp). Los ARNp pueden comprender tanto micro ARN (miARN) como ARN de interferencia pequeño (ARNip) (Meister y Tuschl (2004) Nature 431:343-349 y Bonetta et al. (2004) Nature Methods 1:79-86). Los miARN son agentes reguladores que comprenden aproximadamente 19 ribonucleótidos que son altamente eficaces al inhibir la expresión de los polinucleótidos diana. Véase, por ejemplo Javier et al. (2003) Nature 425: 257-263. Para la interferencia con miARN, el elemento silenciador se puede diseñar para que exprese una molécula de ARNd que forme una estructura en horquilla que

50 contenga una secuencia de 19 nucleótidos que sea complementaria al polinucleótido diana de interés. El miARN puede ser elaborado sintéticamente, o transcrito en forma de un ARN más largo que es escindido con posterioridad para producir el miARN activo. Específicamente, el miARN puede comprender 19 nucleótidos de la secuencia que tiene homología con un polinucleótido diana en orientación efectora y 19 nucleótidos de una secuencia antisentido correspondiente que es complementaria a la secuencia efectora.

60 Cuando se expresa un miARN, se reconoce que se pueden transcribir diversas formas de miARN que incluyen, por

ejemplo, el transcrito primario (denominado "pri-miARN") que es procesado por medio de diferentes etapas nucleolíticas a un miARN precursor más corto (denominado "pre-miARN"); el pre-miARN; o el miARN final (maduro) está presente en un dúplex, siendo referidas las dos hebras como miARN (la hebra que eventualmente emparejará las bases con la diana) y miARN*. El pre-miARN es un sustrato para una forma de Dicer que elimina el dúplex miARN/miARN* del precursor, después de lo cual, de un modo similar a los ARNip, el dúplex se puede introducir en el complejo RISC. Se ha demostrado que los miARN se pueden expresar transgénicamente y pueden ser eficaces a través de la expresión de una forma precursora, en lugar de la forma primaria entera (Parizotto et al. (2004) Genes & Development 18 :2237-2242 y Guo et al. (2005) Plant Cell 17:1376.1386).

Los métodos y las composiciones de la invención emplean elementos silenciadores que cuando se transcriben "forman" una molécula de ARNdh. Por consiguiente, no es necesario que el polinucleótido heterólogo que se está expresando forme el ARNdh por sí mismo, si no que puede interaccionar con otras secuencias en la célula vegetal en el intestino de la plaga después de la ingestión para permitir la formación del ARNdh. Por ejemplo, se puede generar un polinucleótido quimérico que puede silenciar selectivamente el polinucleótido diana expresando un constructo quimérico que comprende la secuencia diana para un miARN o ARNip para una secuencia que corresponde a todo o parte del gen o los genes que se van a silenciar. En esta realización, el ARNdh se "forma" cuando la diana para el miARN o ARNip interacciona con el miARN presente en la célula. El ARNdh resultante puede reducir a continuación el nivel de expresión del gen o los genes que se van a silenciar. Véanse, por ejemplo, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Núm. 60/691,613, presentada el 17 de Junio de 2005, titulada "Methods and Compositions for Gene Silencing. Se puede diseñar el constructo para que tenga una diana para un miARN endógeno o alternativamente, se puede emplear una diana para un miARN heterólogo y/o sintético en el constructo. Si se emplea un miARN heterólogo y/o sintético, éste se puede introducir en la célula en el mismo constructo nucleotídico que el polinucleótido quimérico o en un constructo separado. Como se comenta en alguna parte en la presente memoria, se puede utilizar cualquier método para introducir el constructo que comprende el miARN heterólogo.

IV. Variantes y fragmentos

Por "fragmento" se quiere significar una porción del polinucleótido o una porción de la secuencia de aminoácidos y por tanto la proteína codificada de ese modo. Los fragmentos de un polinucleótido pueden codificar fragmentos de proteína que conservan la actividad biológica de la proteína nativa. Alternativamente, no es necesario que los fragmentos de un polinucleótido que son útiles como elemento silenciador codifiquen fragmentos de proteínas que conserven actividad biológica. De este modo, los fragmentos de una secuencia de nucleótidos pueden oscilar de al menos aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 22 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 75 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, 200 nucleótidos, 300 nucleótidos, 400 nucleótidos, 500 nucleótidos, 600 nucleótidos, 700 nucleótidos y hasta el polinucleótido de longitud completa empleado en la invención. Los métodos para analizar la actividad de un elemento silenciador o un elemento intensificador supresor deseados se describen en alguna parte en la presente memoria.

Se pretende que "variantes" represente secuencias sustancialmente similares. Para los polinucleótidos, una variante comprende una delección y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios internos dentro del polinucleótido nativo y/o una sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más sitios en el polinucleótido nativo. Según se utiliza en la presente memoria, un polinucleótido o polipéptido "nativo" comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos de origen natural, respectivamente. Para los polinucleótidos, las variantes conservativas incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos empleados en la invención. Los polinucleótidos variantes también incluyen polinucleótidos derivados sintéticamente, tales como aquellos generados, por ejemplo, utilizando la mutagénesis dirigida al sitio, pero que continúan conservando la actividad deseada. Generalmente, las variantes de un polinucleótido concreto de la invención (esto es, un elemento silenciador) tendrán al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con ese polinucleótido concreto como se determina por medio de programas de alineamiento de secuencias y parámetros descritos en alguna parte en la presente memoria.

Las variantes de un polinucleótido concreto (esto es, el polinucleótido de referencia) también se pueden evaluar mediante comparación del porcentaje de identidad de secuencia entre el polipéptido codificado por un polinucleótido variante y el polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. El porcentaje de identidad de secuencia entre dos polipéptidos cualesquiera se puede calcular utilizando programas de alineamiento de secuencias y parámetros descritos en alguna parte en la presente memoria. Cuando cualquier par de polinucleótidos dado empleado en la invención se evalúa mediante comparación del porcentaje de identidad de secuencia compartido por los dos polipéptidos que codifican, el porcentaje de identidad de secuencia entre los dos polipéptidos codificados es de al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia.

Se pretende que proteína "variante" represente una proteína derivada de la proteína nativa por delección o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios internos de la proteína nativa y/o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios de la proteína nativa. Las proteínas variantes incluidas en la presente invención son biológicamente activas, esto es, continúan teniendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, como se

comenta en alguna parte en la presente memoria. Tales variantes pueden resultar, por ejemplo, del polimorfismo genético o de la manipulación humana. Las variantes biológicamente activas de una proteína nativa tendrán al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos para la proteína nativa como se determina mediante programas de alineamiento de secuencia y parámetros descritos en alguna parte en la presente memoria. Una variante biológicamente activa de una proteína de la invención puede diferir de esa proteína en tan pocos como 1-15 residuos de aminoácido, tan pocos como 1-10, tal como 6-10, tan pocos como 5, tan pocos como 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácido.

Los siguientes términos se utilizan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos: (a) "secuencia de referencia", (b) "ventana de comparación", (c) "identidad de secuencia", y, (d) "porcentaje de identidad de secuencia."

(a) Según se utiliza en la presente memoria, "secuencia de referencia" es una secuencia definida utilizada como base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, en forma de un segmento de un ADNc o secuencia génica de longitud completa, o el ADNc o la secuencia génica completos.

(b) Según se utiliza en la presente memoria, "ventana de comparación" hace referencia a un segmento contiguo y especificado de una secuencia de polinucleótidos, en donde la secuencia de polinucleótidos de la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (esto es, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de los dos polinucleótidos. Generalmente, la ventana de comparación tiene al menos 20 nucleótidos contiguos de longitud, y opcionalmente puede tener 30, 40, 50, 100, o más. Los expertos en la técnica comprenden que para evitar una elevada similitud con una secuencia de referencia debido a la inclusión de espacios en la secuencia de polinucleótido, típicamente se introduce una penalización del espacio y se resta del número de coincidencias. A menos que se establezca de otro modo, los valores de identidad/similitud de secuencia proporcionados en la presente memoria hacen referencia al valor obtenido utilizando GAP Versión 10 empleando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos utilizando un Peso GAP de 50 y un Peso de la Longitud de 3, y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; % de identidad y % de similitud para una secuencia de aminoácidos utilizando un Peso GAP de 8 y un Peso de la Longitud de 2, y la matriz de puntuación BLOSUM62; o cualquier programa equivalente de los mismos. Por "programa equivalente" se entiende cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualesquiera en cuestión, genera un alineamiento que tiene coincidencias de nucleótido o residuo de aminoácidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico cuando se comparan con el correspondiente alineamiento generado por GAP Versión 10.

(c) Según se utiliza en la presente memoria, "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos hace referencia a los residuos de las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada. Cuando el porcentaje de identidad de secuencia se utiliza en referencia a proteínas se reconoce que las posiciones de los residuos que no son idénticas a menudo difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas, donde los residuos de aminoácido están sustituidos por otros residuos de aminoácido con propiedades químicas similares (p. ej., carga o hidrofobia) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia se puede ajustar al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Las secuencias que difieren en tales sustituciones se dice que tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos en la técnica. Típicamente esto implica puntuar una sustitución conservativa como emparejamiento erróneo parcial en lugar de completo, incrementando de ese modo el porcentaje de identidad de secuencia. De este modo, por ejemplo, cuando se da a un aminoácido idéntico una puntuación de 1 y se da una puntuación de cero a una sustitución no conservativa, se da una sustitución conservativa una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservativas se calcula, p. ej., como un implemento en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

(d) Según se utiliza en la presente memoria, el "porcentaje de identidad de secuencia" representa el valor determinado comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una ventana de comparación, en donde una porción de la secuencia de polinucleótido de la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (esto es, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales existen bases de ácidos nucleicos o residuos de aminoácido idénticos en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

V. Constructos de ADN

No se pretende que el uso del término "polinucleótido" limite la presente invención a los polinucleótidos que comprenden ADN. Los expertos en la técnica reconocerán que los polinucleótidos pueden comprender

ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Tales desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos incluyen las moléculas de origen natural y los análogos sintéticos. Los polinucleótidos de la invención también incluyen todas las formas de secuencias que incluyen, pero no se limitan a, formas de hebra sencilla, formas de doble hebra, horquillas, estructuras de tallo-y-bucle, y similares.

- 5 El polinucleótido que codifica el elemento silenciador o en realizaciones específicas empleadas en los métodos y las composiciones de la invención se puede proporcionar en casetes de expresión para la expresión en una planta u organismo de interés. Se reconoce que se pueden utilizar los elementos silenciadores múltiples que incluyen múltiples elementos silenciadores idénticos, múltiples elementos silenciadores que se dirigen a diferentes regiones de la secuencia diana, o múltiples elementos silenciadores de diferentes secuencias diana. En esta realización, se
10 reconoce que cada elemento silenciador puede estar contenido en una casete única o separada, constructo de ADN, o vector. Como se comenta, se contempla cualquier medio para proporcionar el elemento silenciador. Una planta o célula vegetal se puede transformar con una única casete que comprende ADN que codifica uno o más elementos silenciadores o se pueden utilizar casetes separadas que comprenden cada elemento silenciador para transformar una planta o célula vegetal o célula anfitriona. Del mismo modo, una planta transformada con un componente puede
15 ser transformada con posterioridad con el segundo componente.

La casete de expresión puede incluir secuencias reguladoras 5' y 3' conectadas operablemente al polinucleótido de la invención. Se pretende que "conectado operablemente" represente una conexión funcional entre dos o más elementos. Por ejemplo, una conexión operable entre un polinucleótido de la invención y una secuencia reguladora (esto es, un promotor) es una conexión funcional que permite la expresión del polinucleótido de la invención. Los
20 elementos conectados operablemente pueden ser contiguos o no contiguos. Cuando se utiliza para hacer referencia a la unión de dos regiones codificantes de proteínas, por conectado operablemente se entiende que las regiones codificantes están en el mismo marco de lectura. La casete puede contener adicionalmente al menos un polinucleótido adicional que va a ser co-transformado en el organismo. Alternativamente, el polipéptido o los polipéptidos adicionales se pueden proporcionar en múltiples casetes de expresión. Las casetes de expresión se
25 pueden proporcionar con una pluralidad de sitios de restricción y/o sitios de recombinación para que la inserción del polinucleótido esté bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras. La casete de expresión puede contener adicionalmente genes marcadores seleccionables.

La casete de expresión incluirá en la dirección 5'-3' de la transcripción, una región de inicio de la transcripción y la traducción (esto es, un promotor), un polinucleótido que comprende el elemento silenciador empleado en los
30 métodos y las composiciones de la invención, y una región de terminación de la transcripción y la traducción (esto es, una región de terminación) funcionales en plantas. Las regiones reguladoras (esto es, promotores, regiones reguladoras de la transcripción, y regiones de terminación de la traducción) y/o los polinucleótidos empleados en la invención pueden ser nativos/análogos a la célula anfitriona o entre sí. Alternativamente, las regiones reguladoras y/o el polinucleótido empleados en la invención pueden ser heterólogos con respecto a la célula anfitriona o entre sí.
35 Según se utiliza en la presente memoria, "heterólogo" en referencia a una secuencia es una secuencia que se origina a partir de una especie foránea, o, si es de la misma especie, está sustancialmente modificada a partir de su forma nativa en la composición y/o el locus genómico por la intervención humana deliberada. Por ejemplo, un promotor conectado operablemente a un polinucleótido heterólogo es de una especie diferente de la especie de la cual se obtuvo el polinucleótido, o, si es de la misma especie o una especie análoga, uno o ambos están
40 sustancialmente modificados a partir de su forma original y/o locus genómico, o el promotor no es el promotor nativo para el polinucleótido conectado operablemente. Según se utiliza en la presente memoria, un gen quimérico comprende una secuencia codificante conectada operablemente a una región de inicio de la transcripción que es heteróloga con respecto a la secuencia codificante.

La región de terminación puede ser nativa con respecto a la región de inicio de la transcripción, puede ser nativa con respecto al polinucleótido conectado operablemente que codifica el elemento silenciador, puede ser nativa con respecto al anfitrión vegetal, o puede derivar de otra fuente (esto es, foránea o heteróloga) con respecto al promotor, el polinucleótido que comprende el elemento silenciador, el anfitrión vegetal, o cualquier combinación de los mismos. Las regiones de terminación convenientes se encuentran disponibles a partir del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones terminadoras de la octopina sintasa y de la nopalina sintasa. Véanse también Guerineau et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262:141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) Genes Dev. 5:141-149; Mogen et al. (1990) Plant Cell 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) Gene 91:151-158; Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903; y Joshi et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:9627-9639.

Se sabe que las modificaciones de la secuencia adicionales intensifican la expresión del gen en un anfitrión celular. Estas incluyen la eliminación de secuencias que codifican señales de poliadenilación espúreas, señales del sitio de empalme de exón-intrón, repeticiones de tipo transposón, y otras de tales secuencias bien caracterizadas que pueden ser deletéreas para la expresión del gen. El contenido de G-C de la secuencia se puede ajustar a niveles medios para un anfitrión celular dado, calculados mediante la referencia a genes conocidos expresados en la célula anfitriona. Cuando es posible, la secuencia se modifica para evitar estructuras de ARNm secundarias en horquilla pronosticadas.

60 Al preparar la casete de expresión, se pueden manipular los diferentes fragmentos de ADN, con el fin de proporcionar secuencias de ADN en la orientación apropiada y, cuando sea apropiado, en el marco de lectura

adecuado. Con este fin, se pueden emplear adaptadores o conectores para juntar los fragmentos de ADN o pueden estar implicadas otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, eliminar ADN superfluo, eliminar sitios de restricción, o similares. Con este propósito, pueden estar involucradas la mutagénesis *in vitro*, reparación de cebadores, restricción, hibridación, resustituciones, p. ej., transiciones y transversiones.

- 5 Se pueden utilizar numerosos promotores en la práctica de la invención. El polinucleótido que codifica el elemento silenciador se puede combinar con promotores constitutivos, preferidos por el tejido, u otros promotores para la expresión en plantas.

10 Tales promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, el promotor central del promotor Rsyn7 y otros promotores constitutivos descritos en el documento WO 99/43838 y en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.072.050; el promotor CaMV 35S central (Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812); la actina del arroz (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2:163-171); la ubicuitina (Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 y Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); el promotor de ALS (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.659.026), y similares. Otros promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, los de las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.608.149; 5.608.144; 15 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; 5.608.142; y 6.177.611.

También se podría emplear un promotor inducible, por ejemplo, un promotor inducible por patógenos. Tales promotores incluyen los de las proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR), que son inducidos después de la infección por un patógeno; p. ej., proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanasa, quitinasa, etc. Véanse, por ejemplo, Redolfi et al. (1983) *Neth. J. Plant Pathol.* 89:245-254; Uknes et al. (1992) *Plant Cell* 4:645-656; y Van Loon (1985) *Plant Mol. Virol.* 4:111-116. Véase también el documento WO 99/43819.

20 Tienen interés los promotores que son expresados localmente en o cerca del sitio de la infección por el patógeno. Véanse, por ejemplo, Marineau et al. (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:335-342; Matton et al. (1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-331; Somsisch et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2427-2430; Somsisch et al. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 2:93-98; y Yang (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14972-14977. Véanse también, Chen et al. (1996) *Plant J.* 10:955-966; Zhang et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2507-2511; Warner et al. (1993) *Plant J.* 3:191-201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961-968; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.750.386 (inducible por nematodos); y las referencias allí citadas. Tiene un interés particular el promotor inducible para el gen PRms del maíz, cuya expresión es inducida por el patógeno *Fusarium moniliforme* (véase, por ejemplo, Cordero et al. (1992) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41:189-200).

30 Adicionalmente, como los patógenos encuentran entrada en las plantas a través de heridas o lesiones por insectos, se puede utilizar un promotor inducible por la herida en los constructos de la invención. Tales promotores inducibles por heridas incluyen el gen inhibidor de la proteinasa de patata (pin II) (Ryan (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28:425-449; Duan et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:494-498); wun1 y wun2, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.428.148; win1 y win2 (Stanford et al. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215:200-208); sistemina (McGurl et al. (1992) *Science* 225:1570-1573); WIP1 (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323:73-76); gen MPI (Corderok et al. (1994) *Plant J.* 6(2):141-150); y similares.

35 Se pueden utilizar promotores regulados por agentes químicos para modular la expresión de un gen en una planta a través de la aplicación de un regulador químico exógeno. Dependiendo del objetivo, el promotor puede ser un promotor inducible por agentes químicos, cuando la aplicación del agente químico induce la expresión del gen, o un promotor reprimible por agentes químicos, cuando la aplicación del agente químico reprime la expresión del gen. Los promotores inducibles por agentes químicos son conocidos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a, el promotor In2-2 del maíz, que es activado por protectores herbicidas de bencenosulfonamida, el promotor GST del maíz, que es activado por compuestos electrofílicos hidrófobos que se utilizan como herbicidas de pre-emergencia, y el promotor PR-1a del tabaco, que es activado por ácido salicílico. Otros promotores regulados por agentes químicos de interés incluyen promotores sensibles a esteroides (véase, por ejemplo, el promotor inducible por glucocorticoides en Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421-10425 y McNellis et al. (1998) *Plant J.* 14(2):247-257) y los promotores inducibles por tetraciclina y reprimibles por tetraciclina (véanse, por ejemplo, Gatz et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237, y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.814.618 y 5.789.156).

40 Los promotores preferidos por el tejido se pueden utilizar para dirigir la expresión intensificada dentro de un tejido vegetal concreto. Los promotores preferidos por los tejidos incluyen Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamata et al. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansen et al. (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3):337-343; Russell et al. (1997) *Transgenic Res.* 6(2):157-168; Rinehart et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(3):1331-1341; Van Camp et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevascini et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:181-196; Orozco et al. (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6):1129-1138; Matsuoka et al. (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590; y Guevara-Garcia et al. (1993) *Plant J.* 4(3):495-505. Tales promotores se pueden modificar, si es necesario, para una expresión débil.

Los promotores preferidos por las hojas son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kwon et al. (1994) *Plant Physiol.* 105:357-67; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.*

35(5):773-778; Gotor et al. (1993) Plant J. 3:509-18; Orozco et al. (1993) Plant Mol. Biol. 23(6): 1129-1138; y Matsuoka et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(20):9586-9590.

Los promotores preferidos por la raíz son conocidos y se pueden seleccionar entre los muchos disponibles en la bibliografía o aislados de novo de diferentes especies compatibles. Véanse, por ejemplo, Hire et al. (1992) Plant Mol. Biol. 20(2):207-218 (gen de glutamina sintetasa de específico de raíz de soja); Keller y Baumgartner (1991) Plant Cell 3(10):1051-1061 (elemento de control específico de raíz del gen GRP 1.8 de la judía verde); Sanger et al. (1990) Plant Mol. Biol. 14(3):433-443 (promotor específico de la raíz del gen de la manopina sintasa (MAS) de *Agrobacterium tumefaciens*); y Miao et al. (1991) Plant Cell 3(1):11-22 (clon de ADNc de longitud completa que codifica la glutamina sintetasa citosólica (GS), que es expresado en raíces y nódulos radiculares de la soja). Véase también Bogusz et al. (1990) Plant Cell 2(7):633-641, donde se describen dos promotores específicos de la raíz aislados de genes de hemoglobina de la no leguminosa fijadora de nitrógeno *Parasponia andersonii* y la no leguminosa no fijadora de nitrógeno relacionada *Trema tomentosa*. Los promotores de estos genes se conectaron a un gen informador de β -glucuronidasa y se introdujeron tanto en la no leguminosa *Nicotiana tabacum* como en la leguminosa *Lotus maiziculatus*, y en ambos casos se preservó la actividad del promotor específico de la raíz. Leach y Aoyagi (1991) describen su análisis de los promotores de los genes inductores de la raíz rolC y rolD altamente expresados de *Agrobacterium rhizogenes* (véase Plant Science (Limerick) 79(1):69-76). Concluyeron que el intensificador y los determinantes de ADN preferidos por el tejido están disociados en esos promotores. Teeri et al. (1989) utilizaron la fusión del gen a lacZ para demostrar que el gen de t-DNA de *Agrobacterium* que codifica la octopina sintasa es especialmente activo en la epidermis de la punta de la raíz y que el gen TR2' es específico de la raíz en la planta intacta y estimulado por las heridas en el tejido foliar, una combinación especialmente deseable de características para su uso con un gen insecticida o larvicida (véase EMBO J. 8(2):343-350). El gen TR1', fusionado con *nptII* (neomicina fosfonotransferasa II) mostró características similares. Los promotores preferidos por la raíz adicionales incluyen el promotor del gen VfENOD-GRP3 (Kuster et al. (1995) Plant Mol. Biol. 29(4):759-772); y el promotor rolB (Capana et al. (1994) Plant Mol. Biol. 25(4):681-691. Véanse también las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.837.876; 5.750.386; 5.633.363; 5.459.252; 5.401.836; 5.110.732; y 5.023.179.

En una realización de esta invención el promotor expresado en la planta es un promotor específico vascular tal como el promotor específico del floema. Un promotor "específico vascular", según se utiliza en la presente memoria, es un promotor que es expresado como mínimo en las células vasculares, o un promotor que es expresado preferentemente en células vasculares. No es necesario que la expresión de un promotor específico vascular esté exclusivamente en células vasculares, es posible la expresión en otros tipos de células o tejidos. Un "promotor específico del floema" según se utiliza en la presente memoria, es un promotor expresable en plantas que es expresado al menos en células de floema, o un promotor que es expresado preferentemente en células de floema.

No es necesario que la expresión de un promotor específico del floema esté exclusivamente en células de floema, es posible la expresión en otros tipos de células o tejidos, p. ej., tejido de xilema. En una realización de esta invención, un promotor específico del floema es un promotor expresable en plantas que se expresa al menos en células de floema, en donde la expresión en células que no son de floema es más limitada (o está ausente) en comparación con la expresión en células de floema. Los ejemplos de promotores específicos vasculares o específicos de floema adecuados de acuerdo con esta invención incluyen pero no están limitados a los promotores seleccionados del grupo que consiste en: los promotores SCSV3, SCSV4, SCSV5, y SCSV7 (Schunmann et al. (2003) Plant Functional Biology 30:453-60; el promotor del gen rolC de *Agrobacterium rhizogenes* (Kiyokawa et al. (1994) Plant Physiology 104:801-02; Pandolfini et al. (2003) BioMedCentral (BMC) Biotechnology 3:7, (www.biomedcentral.com/1472-6750/3/7); Graham et al. (1997) Plant Mol. Biol. 33:729-35; Guivarc'h et al. (1996); Almon et al. (1997) Plant Physiol. 115:1599-607; el promotor del gen rolA de *Agrobacterium rhizogenes* (Dehio et al. (1993) Plant Mol. Biol. 23:1199-210); el promotor del gen 5 T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* (Korber et al. (1991) EMBO J. 10:3983-91); el promotor del gen RSs1 de la sacarosa sintasa del arroz (Shi et al. (1994) J. Exp. Bot. 45:623-31); el promotor de badnavirus del moteado amarillo de la Commelina o COYMV (Medberry et al. (1992) Plant Cell 4:185-92; Zhou et al. (1998) Chin. J. Biotechnol. 14:9-16); el promotor del virus de la putrefacción foliar del coco o CFDV (Rohde et al. (1994) Plant Mol. Biol. 27:623-28; Hehn y Rhode (1998) J. Gen. Virol. 79:1495-99); el promotor del virus baciliforme del tungro del arroz o RTBV (Yin y Beachy (1995) Plant J. 7:969-80; Yin et al. (1997) Plant J. 12:1179-80); el gen GS3A de la glutamina sintasa del guisante (Edwards et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3459-63; Brears et al. (1991) Plant J. 1:235-44); los promotores inv CD111 e inv CD 141 de los genes de la invertasa de la patata (Hedley et al. (2000) J. Exp. Botany 51:817-21); el promotor aislado de Arabidopsis que se ha demostrado que tiene expresión específica del floema en tabaco por Kertbundit et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5212-16); la región promotora VAHOX1 (Tornero et al. (1996) Plant J. 9:639-48); el promotor del gen de la invertasa de la pared celular del guisante (Zhang et al. (1996) Plant Physiol. 112:1111-17); el promotor de la proteína endógena del algodón relacionada con la quitinasa de la solicitud de patente de los Estados Unidos publicada 20030106097, un promotor del gen de invertasa ácida de la zanahoria (Ramloch-Lorenz et al. (1993) The Plant J. 4:545-54); el promotor del gen del transportador de sulfato Sultr1; 3 (Yoshimoto et al. (2003) Plant Physiol. 131:1511-17); un promotor de un gen de sacarosa sintasa (Nolte y Koch (1993) Plant Physiol. 101:899-905); y el promotor de un gen transportador de sacarosa de tabaco (Kuhn et al. (1997) Science 275-1298-1300).

Los posibles promotores también incluyen el promotor Black Cherry para la Prunasina Hidrolasa (PH DL1.4 PRO) (Patente de los Estados Unidos Núm. 6.797.859), el promotor de la Tiorredoxina H del pepino y el arroz (Fukuda A et al. (2005). Plant Cell Physiol. 46(11):1779-86), Rice (RSs1) (Shi, T. Wang et al. (1994). J. Exp. Bot. 45(274): 623-

631) y los promotores 1 de la sacarosa sintasa del maíz (Yang., N-S. et al. (1990) PNAS 87:4144-4148), el promotor PP2 de la calabaza Guo, H. et al. (2004) Transgenic Research 13:559-566), el promotor At SUC2 (Truernit, E. et al. (1995) Planta 196(3):564-70., At SAM-1 (S-adenosilmetionina sintetasa) (Mijnsbrugge KV. et al. (1996) Planr. Cell. Physiol. 37(8): 1108-1115), y el promotor del virus baciliforme del tungro del arroz (RTBV) (Bhattacharyya-Pakrasi et al. (1993) Plant J. 4(1):71-79).

La casete de expresión también puede comprender un gen marcador seleccionable para la selección de células transformadas. Los genes marcadores seleccionables se utilizan para la selección de células o tejidos transformados. Los genes marcadores incluyen genes que codifican la resistencia a antibióticos, tales como los que codifican la neomicina fosfotransferasa II (NEO) y la higromicina fosfotransferasa (HPT), así como genes que confieren resistencia a compuestos herbicidas, tales como glufosinato amónico, bromoxinilo, imidazolinonas, y 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D). Otros marcadores seleccionables incluyen marcadores fenotípicos tales como la β -galactosidasa y proteínas fluorescentes tales como la proteína fluorescente verde (GFP) (Su et al. (2004) Biotechnol Bioeng 85:610-9 y Fetter et al. (2004) Plant Cell 16:215-28), la proteína fluorescente cian (CYP) (Bolte et al. (2004) J. Cell Science 117:943-54 y Kato et al. (2002) Plant Physiol 129:913-42), y la proteína fluorescente amarilla (PhiYFP™ de Evrogen, véase, Bolte et al. (2004) J. Cell Science 117:943-54). Para otros marcadores seleccionables, véanse en general, Yarranton (1992) Curr. Opin. Biotech. 3:506-511; Christopherson et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6314-6318; Yao et al. (1992) Cell 71:63-72; Reznikoff (1992) Mol. Microbiol. 6:2419-2422; Barkley et al. (1980) en The Operon, págs. 177-220; Hu et al. (1987) Cell 48:555-566; Brown et al. (1987) Cell 49:603-612; Figge et al. (1988) Cell 52:713-722; Deuschle et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5400-5404; Fuerst et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2549-2553; Deuschle et al. (1990) Science 248:480-483; Gossen (1993) Ph. D. Thesis, University of Heidelberg; Reines et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1917-1921; Labow et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10:3343-3356; Zambretti et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3952-3956; Baim et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5072-5076; Wyborski et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) Topics Mol. Struc. Biol. 10:143-162; Degenkolb et al. (1991) Antimicrob. Agents Chemother. 35:1591-1595; Kleinschmidt et al. (1988) Biochemistry 27:1094-1104; Bonin (1993) Ph. D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551; Oliva et al. (1992) Antimicrob. Agents Chemother. 36:913-919; Hlavka et al. (1985) Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); Gill et al. (1988) Nature 334:721-724. Tales descripciones se incorporan a la presente memoria como referencia. No se pretende que la lista anterior de genes marcadores seleccionables sea limitante. Se puede utilizar cualquier gen marcador seleccionable en la presente invención.

VI. Composiciones que comprenden elementos silenciadores

Se pueden proporcionar uno o más de los polinucleótidos que comprenden el elemento silenciador en forma de una composición externa, tal como una pulverización o un polvo a la planta, parte de planta, semilla, plaga, o una zona de cultivo. En otro ejemplo, se transforma una planta con un constructo de ADN o casete de expresión para la expresión de al menos un elemento silenciador. En cualquiera de las composiciones, el elemento silenciador, cuando es ingerido por un insecto, puede reducir el nivel de una secuencia de la plaga diana y de ese modo controlar la plaga (esto es, cualquier plaga del orden Lepidoptera, tal como, *Spodoptera frugiperda*). Se reconoce que la composición puede comprender una célula (tal como una célula vegetal o una célula bacteriana), en la que un polinucleótido que codifica el elemento silenciador es incorporado establemente al genoma y conectado operablemente a promotores activos en la célula. Las composiciones pueden comprender una mezcla de células, también pueden estar incluidas algunas células que expresan al menos un elemento silenciador. Alternativamente, las composiciones que comprenden los elementos silenciadores pueden no estar contenidas en una célula. La composición se puede aplicar a una zona habitada por una plaga o externamente a una planta (esto es, pulverizando un campo o zona de cultivo) para proteger las plantas de la plaga.

La composición que comprende el elemento silenciador que controla una plaga del orden Lepidoptera puede no comprender un oligopéptido catiónico heterólogo para facilitar la absorción del ARNi en las células del insecto. Por consiguiente, la actividad insecticida se produce en las composiciones de la invención (esto es, la planta, parte de una planta, célula vegetal, o microbio) en ausencia de un oligopéptido catiónico que es heterólogo con respecto a la planta, parte de la planta o microbio. El oligopéptido catiónico no es específico para la diana e interacciona no específicamente con el ARN a través de interacciones electrostáticas y neutralización de la carga para atravesar las membranas y carece de una actividad específica que promueve una interacción específica con una membrana celular.

La composición se puede formular adicionalmente en forma de cebo, que comprende una sustancia alimenticia o un atrayente que intensifica el atractivo de la composición para la plaga.

La composición que comprende el elemento silenciador se puede formular en un portador agrícolamente adecuado y/o aceptable desde el punto de vista medioambiental. Tales portadores pueden ser cualquier material que pueda tolerar el animal, planta o entorno que se vaya a tratar. Además, el portador puede ser tal que la composición permanezca activa en el control de la plaga. Los ejemplos de tales portadores incluyen agua, solución salina, disolución de Ringer, dextrosa u otras disoluciones azucaradas, disolución de Hank, y otras disoluciones salinas acuosas fisiológicamente equilibradas, tampón fosfato, tampón bicarbonato y tampón Tris. Además, la composición puede incluir compuestos que incrementan la vida media de la composición.

Se reconoce que se pueden utilizar secuencias que comprenden polinucleótidos que codifican el elemento silenciador para transformar organismos para ofrecer al microorganismo anfitrión la producción de estos componentes, y la posterior aplicación del organismo anfitrión al entorno de la plaga o las plagas diana. Tales organismos anfitriones incluyen baculovirus, bacterias, y similares. De esta manera, la combinación de polinucleótidos que codifican el elemento silenciador puede ser introducida a través de un vector adecuado en un anfitrión microbiano, y dicho anfitrión aplicado al entorno, o a las plantas o animales.

El término "introducido" en el contexto de la inserción de un ácido nucleico en una célula, representa la "transfección" o "transformación" o "transducción" e incluye la referencia a la incorporación de un ácido nucleico a una célula eucariótica o procariótica donde el ácido nucleico puede ser incorporado establemente al genoma de la célula (p. ej., cromosoma, plásmido, plástido, o ADN mitocondrial), convertido en un replicón autónomo, o expresado transitoriamente (p. ej. ARNm transfectado).

Se pueden seleccionar los anfitriones microbianos que se sabe que ocupan la "fitosfera" (filoplano, filosfera, rizosfera, y/o rizoplano) de uno o más cultivos de interés. Estos microorganismos se seleccionan de manera que sean capaces de competir con éxito en el entorno concreto con los microorganismos de tipo salvaje, proporcionar un mantenimiento estable y una expresión de las secuencias que codifican el elemento silenciador, y deseablemente, proporcionar una mejor protección de los componentes frente a la degradación medioambiental y la inactivación.

Tales microorganismos incluyen bacterias, algas, y hongos. Tienen un interés particular los microorganismos tales como bacterias, p. ej., *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylobacterium*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc*, y *Alcaligenes*, hongos, concretamente levaduras, p. ej., *Saccharomyces*, *Oxytropis*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, y *Aureobasidium*. Tienen un interés concreto las especies bacterianas de la fitosfera tales como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioides*, *Alcaligenes entrophus*, *Clavibacter xyli* y *Azotobacter vinlandii*, y las especies de levaduras de la fitosfera tales como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluentis*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosae*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces rosae*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces verona*, y *Aureobasidium pollulans*. Tienen un interés concreto los microorganismos pigmentados.

Se encuentran disponibles numerosas maneras de introducir el polinucleótido que comprende el elemento silenciador en el anfitrión microbiano en condiciones que permiten el mantenimiento estable y la expresión de semejantes secuencias que codifican nucleótidos. Por ejemplo, se pueden construir casetes de expresión que incluyen los constructos de nucleótidos de interés conectados operablemente a señales reguladoras de la transcripción y la traducción para la expresión de los constructos de nucleótidos, y un homólogo de la secuencia de nucleótidos con una secuencia en el organismo anfitrión, por medio de lo cual se producirá la integración, y/o un sistema de replicación que sea funcional en el anfitrión, por medio del cual se producirá la integración o el mantenimiento estable.

Las señales reguladoras de la transcripción y la traducción incluyen, pero no están limitadas a, promotores, sitios de partida para el inicio de la transcripción, operadores, activadores, intensificadores, otros elementos reguladores, sitios de unión ribosomales, un codón de iniciación, señales de terminación, y similares. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.039.523 y 4.853.331; el documento EPO 0480762A2; Sambrook et al. (2000); Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY); Davis et al. (1980) Advanced Bacterial Genetics (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY); y las referencias allí citadas.

Las células anfitrionas adecuadas incluyen procariotas y eucariotas inferiores, tales como los hongos. Los procariotas ilustrativos, tanto Gram negativos como Gram positivos, incluyen *Enterobacteriaceae*, tales como *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella*, y *Proteus*; *Bacillaceae*; *Rhizobiceae*, tales como *Rhizobium*; *Spirillaceae*, tales como fotobacterias, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrion*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; *Lactobacillaceae*; *Pseudomonadaceae*, tales como *Pseudomonas* y *Acetobacter*; *Azotobacteraceae* y *Nitrobacteraceae*. Entre los eucariotas están los hongos, tales como *Phycomycetes* y *Ascomycetes*, que incluyen levaduras, tales como *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*; y levaduras de *Basidiomycetes*, tales como *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, y similares.

Las características de interés particular en la selección de una célula anfitriona para los fines de la invención incluyen la facilidad para introducir la secuencia codificante en el anfitrión, la disponibilidad de sistemas de expresión, la eficacia de la expresión, la estabilidad en el anfitrión, y la presencia de capacidades genéticas auxiliares. Las características de interés para su uso como microcápsulas de plaguicidas incluyen cualidades protectoras, tales como paredes celulares gruesas, pigmentación, y empaquetamiento intracelular o formación de cuerpos de inclusión; afinidad de las hojas; carencia de toxicidad en mamíferos; atractivo para la ingestión por las plagas; y similares. Otras consideraciones incluyen la facilidad de formulación y manipulación, rentabilidad, estabilidad en el almacenamiento, y similares.

Los organismos anfitriones de particular interés incluyen levaduras, tales como *Rhodotorula spp.*, *Aureobasidium*

spp., *Saccharomyces spp.*, y *Sporobolomyces spp.*, organismos del filoplano tales como *Pseudomonas spp.*, *Erwinia spp.*, y *Flavobacterium spp.*, y otros organismos semejantes, que incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y similares.

5 Las secuencias que codifican los elementos silenciadores incluidas en la invención se pueden introducir en microorganismos que se multiplican sobre plantas (epífitos) para suministrar estos componentes a potenciales plagas diana. Los epífitos, por ejemplo, pueden ser bacterias gram positivas o gram negativas.

10 El elemento silenciador puede ser fermentado en un anfitrión bacteriano y la bacteria resultante se puede procesar y utilizar como pulverización microbiana de la misma manera que se han utilizado las cepas de *Bacillus thuringiensis* como cepas de insecticida. Se puede utilizar cualquier microorganismo adecuado para este fin. Se ha utilizado *Pseudomonas* para expresar endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* como proteínas encapsuladas y las células resultantes se han procesado y pulverizado como insecticida Gaertner et al. (1993), en *Advanced Engineered Pesticides*, ed. L. Kim (Marcel Decker, Inc.).

15 Alternativamente, los componentes se producen introduciendo genes heterólogos en un anfitrión celular. La expresión de las secuencias heterólogas da como resultado, directamente o indirectamente, la producción intracelular del elemento silenciador. Estas composiciones se pueden formular a continuación de acuerdo con técnicas convencionales para la aplicación al entrono que alberga una plaga diana, p. ej., suelo, agua, y follaje de las plantas. Véase, por ejemplo, el documento EPA 0192319, y las referencias allí citadas.

20 Se puede formular un microorganismo transformado con un portador aceptable en composiciones separadas o combinadas que son, por ejemplo, una suspensión, una disolución, una emulsión, un polvo espolvoreable, un gránulo dispersable, un polvo mojable, y un concentrado emulsionable, un aerosol, un gránulo impregnado, un coadyuvante, una pasta para aplicar como recubrimiento, y también encapsulaciones, por ejemplo, en sustancias poliméricas.

25 Tales composiciones descritas más arriba se pueden obtener mediante la adición de un agente tensioactivo, un portador inerte, un conservante, un humectante, un estimulante de la alimentación, un atrayente, un agente de encapsulación, un aglutinante, un emulsionante, un colorante, un protector de UV, un tampón, un agente de flujo de fertilizantes, donadores de micronutrientes, u otras preparaciones que influyen en el crecimiento de la planta. Se pueden combinar uno o más compuestos agroquímicos que incluyen, pero no se limitan a, herbicidas, insecticidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, molusquicidas, acaricidas, reguladores del crecimiento de las plantas, ayudas a la cosecha, y fertilizantes, con portadores, tensioactivos o coadyuvantes empleados habitualmente en la técnica de la formulación u otros componentes para facilitar la manipulación y aplicación del producto a plagas diana concretas. Los portadores y coadyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos y corresponden a las sustancias comúnmente empleadas en la tecnología de la formulación, p. ej., sustancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, agentes humectantes, agentes antiadherentes, aglutinantes, o fertilizantes. Los ingredientes activos de la presente invención (esto es, al menos un elemento silenciador) se aplican normalmente en forma de composiciones y se pueden aplicar a la zona de cultivo, la planta, o la semilla que se vayan a tratar. Por ejemplo, las composiciones se pueden aplicar al grano en la preparación para o durante el almacenamiento en una tolva para cereales o un silo, etc. Las composiciones se pueden aplicar simultáneamente o sucesivamente con otros compuestos. Los métodos de aplicación de un ingrediente activo o una composición que contiene al menos un elemento silenciador incluyen, pero no están limitados a, aplicación foliar, recubrimiento de semillas, y aplicación al suelo. El número de aplicaciones y la tasa de aplicación dependen de la intensidad de la infestación por la plaga correspondiente.

45 Los agentes tensioactivos adecuados incluyen, pero no están limitados a, compuestos aniónicos tales como carboxilatos, por ejemplo, de un metal; carboxilatos de un ácido graso de cadena larga; N-acilsarcosinato; mono- o di-ésteres de ácido fosfórico con etoxilatos de alcoholes grasos o sales de tales ésteres; sulfatos de alcoholes grasos tales como dodecilsulfato de sodio, octadecilsulfato de sodio, o cetilsulfato de sodio; sulfatos de alcoholes grasos etoxilados; alquilfenolsulfatos etoxilados; lignosulfonatos; sulfonatos de petróleo; alquilarilsulfonatos tales como alquilbencenosulfonatos o alquil(inferior)naftalenosulfonatos, p. ej., butilnaftalenosulfonato; sales de productos condensados de naftaleno-formaldehído sulfonados; sales de productos condensados de fenol-formaldehído sulfonados; sulfonatos más complejos tales como los amidosulfonatos, p. ej., el producto de condensación sulfonado de ácido oleico y N-metiltaurina; o los dialquilsulfosuccinatos, p. ej., sulfonato de sodio o succinato de dioctilo. Los agentes no iónicos incluyen productos de condensación de ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, amidos de ácidos grasos o fenoles sustituidos con alquilo o alqueno grasos con óxido de etileno, ésteres grasos de ésteres de alcoholes polihidroxilados, p. ej., ésteres de ácidos grasos y sorbitán, productos de condensación de tales ésteres con óxido de etileno, p. ej., ésteres de ácidos grasos y polioxietilensorbitán, copolímeros de bloques de óxido de etileno y óxido de propileno, glicoles acetilénicos tales como 2,4,7,9-tetraetil-5-decín-4,7-diol, o glicoles acetilénicos etoxilados. Los ejemplos de agentes tensioactivos catiónicos incluyen, por ejemplo, una mono-, di-, o poli-amina alifática tal como un acetato, naftenato u oleato; o aminas que contienen oxígeno tales como un óxido de amina de polioxietilenaquilamina; una amina unida a una amida preparada mediante la condensación de un ácido carboxílico con una di- o poliamina; o una sal de amonio cuaternaria.

60 Los ejemplos de los materiales inertes incluyen, pero no están limitados a, minerales inorgánicos tales como caolín,

filosilicatos, carbonatos, sulfatos, fosfatos, o materiales botánicos tales como corcho, mazorcas de maíz pulverizadas, cáscaras de cacahuete, cáscaras de arroz, y cáscaras de nuez.

Las composiciones que comprenden el elemento silenciador pueden estar en cualquier forma adecuada para la aplicación directa o en forma de un producto concentrado de la composición primaria que requiere dilución con una cantidad adecuada de agua u otros diluyentes antes de su aplicación.

Las composiciones (que incluyen los microorganismos transformados) se pueden aplicar al entorno de una plaga de insectos (tal como una plaga del orden Lepidoptera), por ejemplo, mediante pulverización, atomización, espolvoreado, dispersión, recubrimiento o vertido, introducción en o sobre el suelo, introducción en el agua de irrigación, mediante tratamiento de semillas o aplicación general o espolvoreado en el momento en el que la plaga ha comenzado a aparecer o antes de la aparición de las plagas como medida de protección. Por ejemplo, se pueden mezclar la composición o las composiciones y/o el microorganismo o los microorganismos transformados con el grano para proteger el grano durante el almacenamiento. Generalmente es importante obtener un buen control de las plagas en las fases tempranas del crecimiento de la planta, ya que este es el momento en el que la planta puede ser más gravemente dañada. Las composiciones pueden contener convenientemente otro insecticida si se considera que esto es necesario. En una realización de la invención, la composición o las composiciones se aplican directamente al suelo, en el momento de la plantación, en un forma granular de una composición de un portador y células muertas de una cepa de *Bacillus* o un microorganismo transformado de la invención. Otra realización es una forma granular de una composición que comprende un compuesto agroquímico tal como, por ejemplo, un herbicida, un insecticida, un fertilizante, en un portador inerte, y células muertas de una cepa de *Bacillus* o microorganismos transformados de la invención.

VII. Plantas, partes de plantas, y métodos de introducción de secuencias en las plantas

En una realización, los métodos de la invención implican la introducción de un polipéptido o polinucleótido en una planta. Se pretende que "introducción" signifique la presentación a la planta del polinucleótido o polipéptido de tal manera que la secuencia consiga acceder al interior de una célula de la planta. Los métodos de la invención no dependen de un método concreto para introducir una secuencia en una planta, solamente de que el polinucleótido o polipéptido consiga acceder al interior de al menos una célula de la planta. Los métodos para introducir polinucleótidos o polipéptidos en las plantas son conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, métodos de transformación estable, métodos de transformación transitoria, y método mediados por virus.

Se pretende que "transformación estable" signifique que el constructo nucleotídico introducido en una planta se integra en el genoma de la planta y es susceptible de ser heredado por la progenie del mismo. Se pretende que "transformación transitoria" signifique que un polinucleótido se introduce en la planta y no se integra en el genoma de la planta o que un polipéptido se introduce en una planta.

Los protocolos de transformación así como los protocolos para introducir secuencias de polipéptidos o polinucleótidos en plantas pueden variar dependiendo del tipo de planta o célula vegetal, esto es, monocotiledónea o dicotiledónea, elegida como diana para la transformación. Los métodos de introducción de polipéptidos y polinucleótidos adecuados en células vegetales incluyen microinyección (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4:320-334), electroporación (Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606, transformación mediada por *Agrobacterium* (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.563.055 y Patente de los Estados Unidos Núm. 5.981.840), transferencia génica directa (Paszowski et al. (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722), y aceleración de partículas balísticas (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.945.050; la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.879.918; la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.886.244; y, 5.932.782; Tomes et al. (1995) en *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg y Phillips (Springer-Verlag, Berlin); McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6:923-926); y transformación con Lec1 (documento WO 00/28058). Véanse también Weissinger et al. (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford et al. (1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (cebolla); Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (soja); McCabe et al. (1988) *Bio/Technology* 6:923-926 (soja); Finer y McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182 (soja); Singh et al. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324 (soja); Datta et al., (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (arroz); Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309 (maíz); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (maíz); las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.240.855; 5.322.783; y, 5.324.646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444 (maíz); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (maíz); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature (Londres)* 311:763-764; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.736.369 (cereales); Bytebier et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (Liliaceae); De Wet et al. (1985) en *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, Nueva York), págs. 197-209 (polen); Kaeppler et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418 y Kaeppler et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (transformación mediada por whisker); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (electroporación); Li et al. (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255 y Christou y Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (arroz); Osjoda et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (maíz a través de *Agrobacterium tumefaciens*).

En realizaciones específicas, se pueden proporcionar las secuencias del elemento silenciador de la invención a una planta utilizando una variedad de métodos de transformación transitoria. Tales métodos de transformación transitoria incluyen, pero no están limitados a, la introducción de la proteína o variantes y fragmentos de la misma directamente

en la planta o la introducción del transcrito en la planta. Tales métodos incluyen, por ejemplo, microinyección o bombardeo con partículas. Véanse, por ejemplo, Crossway et al. (1986) *Mol Gen. Genet.* 202:179-185; Nomura et al. (1986) *Plant Sci.* 44:53-58; Hepler et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2176-2180 y Hush et al. (1994) *The Journal of Cell Science* 107:775-784. Alternativamente, los polinucleótidos se pueden transformar transitoriamente en la planta utilizando mecanismos conocidos en la técnica. Tales mecanismos incluyen los sistemas de vectores virales y la precipitación del polinucleótido de una manera que evita la posterior liberación del ADN. De este modo, se puede producir la transcripción a partir del ADN unido a la partícula, pero la frecuencia con la que éste es liberado para integrarse en el genoma se reduce enormemente. Tales métodos incluyen el uso de partículas recubiertas con polietilimina (PEI; Sigma núm. P3143).

En otras realizaciones, el polinucleótido de la invención se puede introducir en las plantas poniendo en contacto las plantas con un virus o ácidos nucleicos virales. Generalmente, tales métodos implican la incorporación de un constructo nucleotídico de la invención a una molécula de ADN o ARN viral. Adicionalmente, se reconoce que los promotores de la invención también incluyen promotores utilizados para la transcripción por las ARN polimerasas virales. Los métodos para introducir polinucleótidos en plantas y expresar una proteína codificada en ellos, que implican moléculas de ADN o ARN viral, son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367, 5.316.931, y Porta et al. (1996) *Molecular Biotechnology* 5:209-221.

Se conocen en la técnica los métodos para la inserción dirigida de un polinucleótido en una localización específica en el genoma de la planta. En una realización, la inserción del polinucleótido en una localización genómica deseada se logra utilizando un sistema de recombinación específico del sitio. Véanse, por ejemplo, los documentos WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855, y WO99/25853. En resumen, el polinucleótido de la invención puede estar contenido en una casete de transferencia flanqueada por dos sitios de recombinación no recombinogénicos. La casete de transferencia es introducida en una planta que tiene incorporado establemente en su genoma un sitio diana que está flanqueado por dos sitios de recombinación no recombinogénicos que corresponden a los sitios de la casete de transferencia. Se proporciona una recombinasa apropiada y la casete de transferencia se integra en el sitio diana. El polinucleótido de interés es integrado de ese modo en una posición cromosómica específica del genoma de la planta.

Las células que han sido transformadas se pueden hacer crecer en plantas de acuerdo con los métodos convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Estas plantas se pueden hacer crecer a continuación, y se pueden polinizar con la misma cepa transformada o con cepas diferentes, e identificar la progenie resultante que tiene la expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada identificada. Se pueden hacer crecer dos o más generaciones para garantizar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene establemente y se hereda y después se cosechan las semillas para asegurarse de que se ha logrado la expresión de la característica fenotípica deseada. De esta manera, la presente invención proporciona semillas transformadas (también referidas como "semillas transgénicas") que tienen un polinucleótido de la invención, por ejemplo, una casete de expresión de la invención, incorporada establemente en su genoma.

Según se utiliza en la presente memoria, el término planta incluye células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejidos celulares de plantas a partir de los cuales se pueden regenerar plantas, callos vegetales, masas vegetales, y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas tales como embriones, polen, óvulos, semillas, hojas, flores, ramas, frutos, almendras, espigas, mazorcas, cáscaras, tallos, raíces, puntas de raíces, anteras, y similares. Se pretende que grano represente la semilla madura producida por los productores comerciales con fines distintos del crecimiento o la reproducción de la especie. La progenie, las variantes, y los mutantes de las plantas regeneradas también se incluyen dentro del alcance de la invención, siempre que estas partes comprendan los polinucleótidos introducidos.

La presente invención se puede utilizar para la transformación de cualquier especie de planta, incluyendo, pero sin limitarse a, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los ejemplos de especies de plantas de interés incluyen, pero no están limitados a, maíz (*Zea mays*), *Bras sica* sp. (p. ej., *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), concretamente aquellas especies de *Brassica* útiles como fuentes de aceite de semilla, alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), mijo (p. ej., mijo perla (*Pennisetum glaucum*), mijo común (*Panicum miliaceum*), mijo menor (*Setaria italica*), mijo dedo (*Eleusine coracana*)), girasol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Cartharzus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuet es (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), árboles cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus carica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum* spp.), avenas, cebada, hortalizas, plantas ornamentales, y coníferas.

Las hortalizas incluyen tomates (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (p. ej., *Lactuca sativa*), judías verdes (*Phaseolus vulgaris*), judía de Lima (*Phaseolus limensis*), guisantes (*Lathyrus* spp.), y miembros del género *Cucumis* tales como pepino (*C. sativus*), melón galia (*C. cantalupensis*), y melón (*C. melo*). Las plantas ornamentales incluyen

azalea (*Rhododendron* spp.), hortensia (*Macrophylla hydrangea*), hibiscus (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipanes (*Tidipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petunias (*Petunia hybrida*), claveles (*Dianthus caryophyllus*), flor de pascua (*Euphorbia pulcherrima*), y crisantemos.

5 Las coníferas que se pueden emplear en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, pinos tales como el pino de incienso (*Pinus taeda*), pino ellioti (*Pinus elliotii*), pino real americano (*Pinus ponderosa*), pino contorto (*Pinus contorta*), y pino de Monterrey (*Pinus radiata*); abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); tsuga del Canadá (*Tsuga canadensis*); picea de Sitka (*Picea glauca*); secuoya roja (*Sequoia sempervirens*); abetos verdaderos tales como el abeto púrpura (*Abies amabilis*) y el abeto balsámico (*Abies balsamea*); y cedros tales como cedro rojo del Pacífico (*Thuja plicata*) y falso ciprés de Nootka (*Chamaecyparis nootkatensis*). En realizaciones específicas, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, alfalfa, girasol, *Brassica*, soja, algodón, cártamo, cacahuete, sorgo, trigo, mijo, tabaco, etc.). En otras realizaciones, las plantas de maíz y soja son óptimas, y en otras realizaciones más las plantas de maíz son óptimas.

10 Otras plantas de interés incluyen plantas de grano que proporcionan semillas de interés, plantas con semillas oleosas, y plantas leguminosas. Las semillas de interés incluyen semillas de grano, tales como maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, centeno, etc. Las plantas con semillas oleosas incluyen algodón, soja, cártamo, girasol, *Brassica*, maíz, alfalfa, palma, coco, etc. Las plantas leguminosas incluyen judías y guisantes. Las judías incluyen guar, algarrobo, fenogreco, soja, judías verdes, caupí, judía mung, judía de Lima, haba, lentejas, garbanzos, etc.

VIII. Métodos de uso

20 Los métodos de la invención comprenden métodos para controlar una plaga (esto es, plaga del orden Lepidoptera, tal como, *Spodoptera frugiperda*). El método comprende alimentar a una plaga con una composición que comprende un elemento silenciador de la invención, en donde dicho elemento silenciador, cuando es ingerido por una plaga (esto es, plagas del orden Lepidoptera, tales como, *Spodoptera frugiperda*), reduce el nivel de un polinucleótido diana de la plaga y de ese modo controla la plaga. La plaga puede ser alimentada con el elemento silenciador de diferentes maneras. Por ejemplo, en una realización, el polinucleótido que comprende el elemento silenciador es introducido en una planta. A medida que el Lepidóptero se alimenta sobre la planta o parte de la misma que expresa estas secuencias, el elemento silenciador es suministrado a la plaga. Cuando el elemento silenciador es suministrado a la planta de esta manera, se reconoce que el elemento silenciador puede estar expresado constitutivamente o alternativamente, puede ser producido de una manera específica de la fase empleando los diferentes promotores inducibles o preferidos por los tejidos o regulado evolutivamente que se comentan en alguna parte en la presente memoria. En realizaciones específicas, el elemento silenciador se expresa en las raíces, el pedúnculo o el tallo, la hoja incluyendo el pedicelo, el xilema y el floema, el fruto o tejido reproductor, la seda, las flores y todas sus partes o cualquier combinación de las mismas.

35 En otro método, se aplica una composición que comprende al menos un elemento silenciador de la invención a una planta. En tales realizaciones, el elemento silenciador se puede formular en un portador agrónomicamente adecuado y/o aceptable desde el punto de vista medioambiental, que es preferiblemente, adecuado para la dispersión en los campos. Además, el portador también puede incluir compuestos que incrementan la vida media de la composición. En realizaciones específicas, la composición que comprende el elemento silenciador se formula de tal manera que éste persiste en el entorno durante un tiempo suficiente para permitir que sea suministrado a una plaga. En tales realizaciones, la composición se puede aplicar a una zona habitada por una plaga. En una realización, la composición se aplica externamente a una planta (esto es, mediante pulverización en un campo) para proteger a la planta de las plagas.

45 En ciertas realizaciones, los constructos de la presente invención se pueden integrar con cualquier combinación de secuencias de polinucleótidos de interés con el fin de crear plantas con un rasgo deseado. Un rasgo, según se utiliza en la presente memoria, hace referencia al fenotipo derivado de una secuencia o grupos de secuencias concretos. Por ejemplo, los polinucleótidos de la presente invención se pueden integrar con cualquier otro polinucleótido que codifique un polipéptido que tenga actividad plaguicida y/o insecticida, tal como otras proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* (descritas en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.366.892; 5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; y Geiser et al. (1986) Gene 48:109), lectinas (Van Damme et al. (1994) Plant Mol. Biol. 24:825, pentina (descrita en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.981.722), y similares. Las combinaciones generadas también pueden incluir múltiples copias de cualquier polinucleótido de interés. Los polinucleótidos de la presente invención también se pueden integrar con cualquier otro gen o combinación de genes para producir plantas con una variedad de combinaciones de rasgos deseados que incluyen, pero no se limitan a, rasgos deseables para alimentos para animales tales como genes para alto contenido en aceite (p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.232.529); aminoácidos equilibrados (p. ej., hordotioninas (Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.990.389; 5.885.801; 5.885.802; y 5.703.409); cebada con elevado contenido de lisina (Williamson et al. (1987) Eur. J. Biochem. 165:99-106; y documento WO 98/20122) y proteínas con elevado contenido de metionina (Pedersen et al. (1986) J. Biol. Chem. 261:6279; Kirihara et al. (1988) Gene 71:359; y Musumura et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12:123)); incremento de la digestibilidad (p. ej., proteínas modificadas para el almacenamiento (Solicitud de los Estados Unidos Núm. de Serie 10/053,410, presentada el 7 de Noviembre de 2001); y tiorredoxinas (Solicitud de los Estados Unidos Núm. de Serie 10/005,429, presentada el 3 de Diciembre de 2001)).

Los polinucleótidos de la presente invención también se pueden integrar con rasgos deseables para la resistencia a enfermedades o herbicidas (p. ej., genes de detoxificación de fumonisina (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.792.931); genes de avirulencia y resistencia a enfermedades (Jones et al. (1994) Science 266:789; Martin et al. (1993) Science 262:1432; Mindrinos et al. (1994) Cell 78:1089); mutantes de acetolactato sintasa (ALS) que conducen a una resistencia a herbicidas tales como las mutaciones S4 y/o Hra; inhibidores de la glutamina sintasa tales como fosfinotricina o basta (p. ej., gen bar); y resistencia a glifosato (gen EPSPS)); y rasgos deseables para el procesamiento o los productos procesados tales como elevado contenido de aceite (p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.232.529); aceites modificados (p. ej., genes de desaturasa de ácidos grasos (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.952544; documento WO 94/11516)); almidones modificados (p. ej., ADPG pirofosforilasas (AGPasa), almidón sintasas (SS), enzimas ramificadoras de almidón (SBE), y enzimas des-ramificadoras de almidón (SDBE)); y polímeros o bioplásticos (p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.602.321; beta-cetotiolasa, polihidroxibutirato sintasa, y acetoacetil-CoA reductasa (Schubert et al. (1988) J. Bacteriol. 170:5837-5847) facilitan la expresión de los polihidroxialcanoatos (PHA)). También se podrían combinar los polinucleótidos de la presente invención con polinucleótidos que proporcionan rasgos agronómicos tales como esterilidad masculina (p. ej., véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.583.210), resistencia de los pedúnculos, momento de floración, o rasgos para la tecnología de la transformación tales como regulación del ciclo celular o redireccionamiento de genes (p. ej., documentos WO 99/61619, WO 00/17364, y WO 99/25821).

Estas combinaciones integradas se pueden crear mediante cualquier método incluyendo, pero sin estar limitado a, cruce de plantas mediante cualquier metodología convencional o TopCross, o transformación genética. Si las secuencias se integran transformando genéticamente las plantas, las secuencias de polinucleótidos de interés se pueden combinar en cualquier momento y en cualquier orden. Por ejemplo, se puede utilizar una planta transgénica que comprende uno o más rasgos deseados como diana para introducir rasgos adicionales por medio de una transformación posterior. Los rasgos se pueden introducir simultáneamente en un protocolo de co-transformación con los polinucleótidos de interés proporcionados por cualquier combinación de casetes de transformación. Por ejemplo, si se introducen dos secuencias, las dos secuencias pueden estar contenidas en casetes de transformación separadas (trans) o contenidas en la misma casete de transformación (cis). La expresión de las secuencias puede ser dirigida por el mismo promotor o por promotores diferentes. En ciertos casos, puede ser deseable introducir una casete de información que suprima la expresión del polinucleótido de interés. Esta se puede combinar con cualquier combinación de otras casetes de supresión o casetes de expresión en exceso para generar la combinación deseada de rasgos en la planta. Se reconoce adicionalmente que las secuencias de polinucleótidos pueden ser integradas en una localización genómica deseada utilizando un sistema de recombinación específico del sitio. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 99/25821, WO 99/25854, WO 99/25840, WO 99/25855, y WO 99/25853.

Los métodos y las composiciones pueden permitir un incremento en el ARNi producido a partir del elemento silenciador. Los métodos y las composiciones pueden emplear un primer polinucleótido que comprende un elemento silenciador para una secuencia de la plaga diana conectado operablemente a un promotor activo en la célula vegetal; y, un segundo polinucleótido que comprende un elemento intensificador del supresor que comprende la secuencia de la plaga diana o una variante o fragmento activos de la misma conectada operablemente a un promotor activo en la célula vegetal. La expresión combinada del elemento silenciador con el elemento intensificador del supresor conduce a un incremento de la amplificación del ARN inhibidor producido a partir del elemento silenciador por encima de la alcanzable solamente con la expresión del elemento silenciador solo. Además de un incremento de la amplificación de la propia especie de ARNi específico, los métodos y las composiciones permiten adicionalmente la producción de una población diversa de especies de ARNi que pueden intensificar la eficacia de la interrupción de la expresión del gen diana. Como tal, cuando el elemento intensificador del supresor se expresa en una célula vegetal combinado con el elemento silenciador, los métodos y la composición pueden permitir la producción sistémica de ARNi en toda la planta; la producción de cantidades de ARNi mayores que las que se observarían solamente con el constructo del elemento silenciador solo; y, la carga mejorada del ARNi en el floema de la planta, proporcionando de ese modo un mejor control de los insectos que se alimentan del floema por medio de un enfoque de ARNi. De este modo, los diferentes métodos y composiciones proporcionan métodos mejorados para el suministro de ARN inhibidor al organismo diana. Véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Núm. 61/021.676, titulada "Compositions and Methods for the Suppression of Target Polynucleotide", presentada el 17 de Enero de 2008.

Según se utiliza en la presente memoria, un "elemento intensificador del supresor" comprende un polinucleótido que comprende la secuencia diana que se va a suprimir o un fragmento o variante activos de la misma. Se reconoce que no es necesario que el elemento intensificador del supresor sea idéntico a la secuencia diana, pero en lugar de eso, el elemento intensificador del supresor puede comprender una variante de la secuencia diana, con tal que el elemento intensificador del supresor tenga suficiente identidad de secuencia con la secuencia diana para permitir un incremento del nivel del ARNi producido por el elemento silenciador por encima del alcanzable solamente con la expresión del elemento silenciador. De un modo similar, el elemento intensificador del supresor puede comprender un fragmento de la secuencia diana, en donde el fragmento tiene una longitud suficiente para permitir un incremento del nivel del ARNi producido por el elemento silenciador por encima del alcanzable solamente con la expresión del elemento silenciador. De este modo, el elemento intensificador del supresor comprende un fragmento o una variante de un polinucleótido que codifica un polipéptido de una hormona juvenil. En otras realizaciones más, el elemento intensificador del supresor comprende un polinucleótido mostrado en el SEQ ID NO: 1 o un fragmento o variante

activos del mismo.

Se reconoce que se pueden emplear múltiples elementos intensificadores del supresor de la misma secuencia diana o de secuencias diana diferentes, o de regiones diferentes de la misma secuencia diana. Por ejemplo, los elementos intensificadores del supresor empleados pueden comprender fragmentos de la secuencia diana derivados de una región diferente de la secuencia diana (esto es, de la UTR 3', la secuencia codificante, el intrón, y/o la UTR 5'). Adicionalmente, el elemento intensificador del supresor puede estar contenido en una casete de expresión, como se describe en alguna parte en la presente memoria, y en realizaciones específicas, el elemento intensificador del supresor está sobre el mismo o sobre diferente vector o constructo de ADN que el elemento silenciador. El elemento intensificador del supresor puede estar conectado operablemente a un promotor como se describe en la presente memoria. Se reconoce que el elemento intensificador del supresor puede ser expresado constitutivamente o alternativamente, puede ser producido de una manera específica de la fase empleando los diversos promotores inducibles o preferidos por el tejido o regulados evolutivamente que se comentan en alguna parte en la presente memoria.

En realizaciones específicas, que emplean tanto un elemento silenciador como el elemento intensificador del supresor, la producción sistémica de ARNi se produce en toda la planta. En realizaciones adicionales, la planta o partes de la planta de la invención tienen una carga mejorada del ARNi en el floema de la planta de la que se observaría con la expresión del constructo del elemento silenciador solo y, de ese modo proporciona un mejor control de los insectos que se alimentan del floema a través del enfoque del ARNi. En realizaciones específicas, las plantas, partes de plantas, y células vegetales de la invención se pueden caracterizar adicionalmente por permitir la producción de una diversidad de especies de ARNi que pueden intensificar la eficacia de la interrupción de la expresión del gen diana.

En realizaciones específicas, la expresión combinada del elemento silenciador y el elemento intensificador del supresor aumenta la concentración del ARN inhibidor en la célula vegetal, planta, parte de planta, tejido vegetal o floema por encima del nivel que se alcanza cuando el elemento silenciador se expresa solo.

Según se utiliza en la presente memoria, un "incremento del nivel de ARN inhibidor" comprende cualquier incremento estadísticamente significativo en el nivel del ARNi producido en una planta que tiene la expresión combinada cuando se compara con una planta de control apropiada. Por ejemplo, un incremento en el nivel de ARNi en la planta, parte de la planta o la célula vegetal puede comprender al menos un incremento de aproximadamente 1%, aproximadamente 1%-5%, aproximadamente 5%-10%, aproximadamente 10%-20%, aproximadamente 20%-30%, aproximadamente 30%-40%, aproximadamente 40%-50%, aproximadamente 50%-60%, aproximadamente 60%-70%, aproximadamente 70%-80%, aproximadamente 80%-90%, aproximadamente 90%-100% o mayor en el nivel de ARNi en la planta, parte de la planta, célula vegetal, o floema cuando se compara con un control apropiado. En otras realizaciones, el incremento del nivel de ARNi en la planta, parte de la planta, célula vegetal, o floema puede comprender un incremento de al menos aproximadamente 1 vez, aproximadamente 1 vez - 5 veces, aproximadamente 5 veces - 10 veces, aproximadamente 10 veces - 20 veces, aproximadamente 20 veces - 30 veces, aproximadamente 30 veces - 40 veces, aproximadamente 40 veces - 50 veces, aproximadamente 50 veces - 60 veces, aproximadamente 60 veces - 70 veces, aproximadamente 70 veces - 80 veces, aproximadamente 80 veces - 90 veces, aproximadamente 90 veces - 100 veces o más en el nivel del ARNi en la planta, parte de la planta, célula vegetal o floema cuando se compara con un control apropiado. Los métodos para analizar un incremento en el nivel de ARNi se comentan en alguna parte en la presente memoria.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Experimental

Ejemplo 1. Genes diana específicos y elementos silenciadores que ocasionan actividad insecticida contra *Spodoptera frugiperda*.

La interrupción de la función de genes de insectos a través de ARNi puede producir una actividad específica contra insectos diana. Esta especificidad se intensifica mediante el suministro de los ARNdH por medio de plantas transgénicas. La identificación de la función del gen en insectos a través del ARNi ha estado en gran parte limitada a la inyección de los ARNdH. De hecho, los experimentos del pasado han indicado que los insectos no son capaces de una respuesta de ARNi sistémica basada en la exposición a ARNdH.

Como se describe más abajo, los autores de la presente invención han demostrado la actividad aguda de numerosos pares de ARNdH por medio de experimentos de inyección y adicionalmente han demostrado el antagonismo de insectos por medio de la ingestión de los ARNdH. Esta evidencia identifica varias combinaciones de pares de gen/cebador con claras propiedades insecticidas. El uso de ARNdH en plantas transgénicas también aborda la complicación potencial de la expresión de proteínas heterólogas y los posibles riesgos de reacción alérgica, actividad fuera de la diana, y acumulación medioambiental o biológica. Los datos presentados más abajo representan el primer ensayo de interrupción de estos genes concretos dando como resultado una actividad insecticida en organismos completos y el primer informe sobre la actividad insecticida de los ARNdH contra *Spodoptera frugiperda*.

La invención describe genes diana específicos y las secuencias de ARNdH que ocasionan la actividad insecticida

5 contra el Lepidóptero *Spodoptera frugiperda* por medio de la interferencia con ARN de la expresión del gen diana. La interrupción de los genes elegidos como diana por las secuencias de ARNd_h puede ser ampliamente insecticida en numerosas especies. Las secuencias de ARNd_h específicas presentan actividad insecticida tras la ingestión y se pueden utilizar con un modo de suministro de plantas transgénicas. La Tabla 1 proporciona el polinucleótido de la secuencia diana de *Spodoptera frugiperda*, una breve descripción de la función de la proteína codificada por la secuencia diana, y un SEQ ID NO. La Tabla 2 proporciona un resumen de los cebadores utilizados para suprimir el polinucleótido diana. En la lista de secuencias se incluyen secuencias diana y cebadores adicionales como referencia solamente.

Tabla 1. Polinucleótido diana de *Spodoptera frugiperda*.

SEQ ID NO: 1	
>ise1c.pk002.m13	Hormona juvenil problema
<p>CAAGCATCCAACATGGTATCCGACTTCAGGAAGAAGCTCCTCCACGTTCCTCAAGTCCTTTCGACACGGAC GGCAGCGGCAACATCGAGAAGGATGACTTCTGTATGGCATCGAAAGGATAACCAAGACCAGAGGCTGGAAAGCT GGAGACGACAAAATACAAATTTGTCGAGGAGACCCCTATTGAAGATCTGGGACGGCATCCAGAAGGTGCTGACGAG AACAAAGGACGGACAGGTCAGCCAGGACGAGTGGATCGCTATGTGGGACAAGTACTCCAGAACCCTGTCGGAGGGC TTCGAGTGGCAGACCCCTGTACTGCAAGTTCCGTTCACTCTTGAAGAGCCAGCGACGATGGATCCATCGACAGC GAGGAGTTCCTCTGTGTACGCCCTGTTCCGACCTGGACAANGACGANGCTGTGGCTGCCTTCAAGAAAGATGGC TAACGGTAAGTCCGGAAGTGTCTCTGGGCTTGAGTTCACCGACCTGTGGAANGAGTACTTCTCATCCCGGAAGACTNG AACGCTGCCCGGCAAN</p>	

Tabla 2 Lista de cebadores de ARNdH. (Nota: la secuencia del cebador de ARN efector y las secuencias del cebador de ARN antisentido mostradas en la tabla 2 fueron generadas con 2 residuos de timina en el extremo 3').

Núm. cebador	ID Gen Diana	Seq ID	Diana	Hebra efectora	Hebra antisentido	SEQ ID NO Diana/efectora/antisentido
0075	Hormona juvenil diol quinasa	ise1c.pk002.m13	AACATGGTATCCGACTT CAGGAA	CAUGGUAUCCGACUUCAG G	CCUGAAGUCCGAUA CCAUG	51/52/53
0076	Hormona juvenil diol quinasa	ise1c.pk002.m13	AAGGTCGCTGACGAGAA CAAGGA	GGUCCUGACGAGAACA G	CUUUUCUCGUCAG CGACC	54/55/56
0077	Hormona juvenil diol quinasa	ise1c.pk002.m13	AAGTCTCCTGGGCTTGA GTTCCA	GUGUCCUGGGCUUGAGUU C	GAACUCAAGCCCAG GACAC	57/58/59

Análisis de alimentación con gotitas para la evaluación de las propiedades insecticidas de ARNdh de 21 unidades contra el cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*

Se adquirieron cantidades de 10 nanomoles de cebadores sometidos a eliminación de las sales de 21 unidades de Proligo (Sigma Aldrich, St. Louis, MS). La muestra liofilizada se solubilizó en agua sin nucleasa a una concentración de 100 µMolar. La disolución de partida se diluyó en sacarosa al 20% que contenía colorante alimentario Blue McCormick. Se dispensaron gotitas de 0,5 µl de esta disolución en un círculo en una placa Petri de 65 mm recubierta con Parafilm. Se utilizaron blancos de sacarosa como controles. A continuación se añadieron entre 20 y 30 cogolleros del maíz neonatos al centro del círculo de gotitas y la placa de petri se selló con Parafilm. Después de dos horas, los neonatos con los tractos digestivos azules se retiraron y se colocaron sobre dieta para insectos lepidópteros multiespecie convencional. Los insectos se evaluaron a las 48, 72, y 96 horas de la sensibilización para determinar la mortalidad y la inhibición del crecimiento.

También se realizaron de esta manera diluciones seriadas que comenzaban con una dosis elevada 20 µM y que incluían concentraciones 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6, y 0 µMolar.

Tabla 3

Núm. Cebador	Gen diana	Rep 1		Rep 2		Media combinada
		Insectos tratados	Peso medio 72H	Insectos tratados	Peso medio 72H	
75	Hormona juvenil diol quinasa	9	10	11	11	11
	Control sacarosa	14	17	15	18	18

15 Análisis de alimentación con gotitas de sacarosa

Se alimentaron larvas neonatas con ARNdh 25 µM. Los insectos tratados se pesaron en masa a las 72 horas y se compararon con los controles de sacarosa. Se promediaron 2 réplicas del experimento.

Análisis de alimentación de infección para la evaluación de las propiedades insecticidas de ARNdh de 21 unidades contra cogolleros del maíz *Spodoptera frugiperda*

20 Se inyectaron cogolleros del maíz en el segundo ínstar utilizando un micromanipulador y agujas de microinyección colocadas sobre un extractor de agujas horizontal Sutter Instrument (Novato, CA) P-2000. La aguja se volvió a cargar con disolución de ARNdh. Los experimentos de inyección iniciales emplearon una concentración de 2 µg/µl (véase la Tabla X). Esta tasa produjo una elevada mortalidad con todos los cebadores sometidos a ensayo. Se llevaron a cabo análisis posteriores con concentraciones más bajas. Se incluyó colorante alimentario Blue McCormick en la disolución de ARNdh para visualizar mejor el proceso de inyección. Antes de la inyección, los insectos se fijaron a un portaobjetos del microscopio utilizando una barra de pegamento (Office Depot, Delray Beach, FL). La aguja de inyección se conectó a una jeringa hipodérmica de 20 ml por medio de tubos de Teflon. La aguja de inyección se montó después sobre un micromanipulador Leitz. La disolución de ARNdh se dispensó desde la aguja de microinyección presionando el émbolo de la jeringa de 20 ml. Los volúmenes de inyección fueron variables pero promediaron aproximadamente 250 nL (basándose en la inyección de aproximadamente 20 insectos inyectados a partir de un volumen de 5 µl cargado en la aguja). Después de la inyección, los insectos se retiraron del portaobjetos del microscopio con la ayuda de un pincel de pelo de camello fino humedecido. Los insectos se colocaron después sobre una dieta multiespecie y se evaluaron para determinar la mortalidad a las 24 y 48 horas. Se utilizaron inyecciones de agua como controles. También se incluyeron como controles negativos cebadores de control de ARNip *Silencer*® Negative Control Núm. 1, 2, y 3 de Ambion (Austin, TX).

Tabla 4

Núm. Cebador	Gen diana	Núm. inyectado	Vivo	Muerto
75	Hormona juvenil diol quinasa	6	0	6
	Agua	8	7	1

Microinyección de ARNdh [2 µg/µl].

Tabla 5

Microinyección de ARNdH [0,7 µg/µl] en larvas neonatas FAW							
Núm. cebador	Gen diana	Rep 1			Rep 2		
		Núm. inyectado	Muerto 24H	Muerto 48H	Núm. inyectado	Muerto 24H	Muerto 48H
75	hormona juvenil diol quinasa 1	7	2	3	11	7	7
	Cebador control Ambion 1	6	0	0	11	0	0
	Cebador control Ambion 2	11	0	0	8	0	0
	Cebador control Ambion 3	12	1	1	9	1	1

Análisis de microinyección utilizando dosis de 0,7 µg/µl de ARNdH de 21 unidades. Nota; En algunas ocasiones, la mortalidad fue inferior a las 48 horas que a las 24 horas. Esto es debido a insectos moribundos que se recuperan en un momento posterior.

5 Análisis de dieta tópica para la evaluación de propiedades insecticidas de ARNdH de 21 unidades contra el cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*

10 El término "análisis de dieta tópica" hace referencia a análisis en los que las dietas artificiales son pipeteadas en placas de microtitulación y la disolución de ARNdH es dispensada sobre la superficie de la dieta. En los experimentos con ARNdH, se dispensaron 100 µl de dieta por pocillo. La superficie del pocillo se trató a continuación con 10 µl de una disolución de ARNdH de concentraciones variables. Las placas se infestaron después con 1 cogollero del maíz neonato por pocillo y se sellaron con Mylar. El sellado de Mylar se agujereó con un alfiler para insectos pequeños para permitir el intercambio de aire. Después las placas se almacenaron en una cámara de crecimiento a 28°C y el análisis se puntuó para determinar la atrofia o la mortalidad a los 4 días. La Tabla 6-12 representa varios experimentos que utilizan este método. La Tabla 13 proporciona un resumen de los datos.

15 En el análisis tópico núm. 1, los cebadores que mostraron previamente actividad en los análisis de inyección se sometieron a ensayo en un análisis de dieta tópica para FAW. Estos resultados se muestran en la Tabla 6. Se utilizó una disolución 50 µMolar (0,66 µg/µl) como concentración de ensayo. Se cargaron 5 µl de esta muestra sobre la parte superior de 100 µl de dieta que produjo una concentración final de 2,5 µMolar o 30 ppm. Además de A1-A11 (A12 es un control negativo), las otras muestras son aquellas sin ortólogos humanos conocidos. La placa se infestó con aprox. 5 neonatos/pocillo. El período de puntuación fue de 72 horas.

25 En el análisis tópico núm. 2, se sometieron a ensayo cebadores en un análisis de dieta tópica para FAW, y los resultados se muestran en la tabla 7. En este experimento, se diluyó una disolución de partida de 2,7 µg/µl a una concentración de partida de 0,67 µg/µl. Se llevó a cabo una dilución seriada a la mitad para producir disoluciones de partida de 0,32 µg/µl y 0,16 µg/µl. Se añadieron 5 µl de estas disoluciones de partida a los 100 µl de dieta produciendo concentraciones finales de 30, 15, y 8 ppm en la dieta. El período de puntuación fue de 72 horas.

30 En el análisis tópico núm. 3, se sometieron a ensayo cebadores en un análisis de dieta tópica para FAW, y los resultados se muestran en la tabla 8. En este experimento, la disolución de partida de 2,7 µg/µl se diluyó a una concentración de partida de 0,67 µg/µl. Se llevó a cabo una dilución seriada a la mitad para producir disoluciones de partida de 0,32 µg/µl y 0,16 µg/µl. Se añadieron 5 µl de estas disoluciones de partida a los 100 µl de dieta produciendo concentraciones finales de 30, 15, y 8 ppm en la dieta. Este es una réplica del experimento previo. El período de puntuación fue de 72 horas.

35 En el análisis tópico núm. 4, se sometieron a ensayo cebadores en un análisis de dieta tópica para FAW, y los resultados se muestran en la tabla 9. En este experimento, la disolución de partida de 2,7 µg/µl se diluyó a una concentración de partida de 0,67 µg/µl. Se llevó a cabo una dilución seriada a la mitad para producir disoluciones de partida de 0,32 µg/µl y 0,16 µg/µl. Se añadieron 5 µl de estas disoluciones de partida a los 100 µl de dieta produciendo concentraciones finales de 30, 15, y 8 ppm en la dieta. El período de puntuación fue de 72 horas.

Un resumen de los datos del análisis tópico mostrados en las tablas 6-9 aparece en la Tabla 10.

Tabla 6. (Nota: la secuencia del cebador de ARN efector y las secuencias del cebador de ARN antisentido mostradas en las tabla 6 fueron generadas con 2 residuos de timina en el extremo 3').

Muestra	Id sec	Id gen	Secuencia diana	directo	inverso	30 ppm	SEQ ID NO Región diana/efectora/antisentido
0075	ise1c.pk002.m13	Hormona juvenil problema	AACATGGTATCCGACTTC AGGAA	CAUGGUAUCCGACTUU CAGG	CCUGAAAGUCCGAU ACCAUG		51/52/53

Tabla 7 (Nota: la secuencia del cebador de ARN efector y las secuencias del cebador de ARN antisentido mostradas en la tabla 7 fueron generadas con 2 residuos de timina en el extremo 3').

Muestra	Id sec	Id gen	Secuencia diana	directo	inverso	30 ppm	SEQ ID NO	
							Secuencia diana	Región diana/efectora/antisentido
0075	Juvenil ise1c.pk00 2.m13	Hormona juvenil problema	AACATGGTATCCGAC TTCAGGAA	CAUGGUAUCCGACUUC AGG	CCUGAAGUCCGGAU ACCAUG		51/52/53	
0076			AAGGTCGCTGACGA GAACAAGGA	GGUCGCUGACGAGAAC AAG	CUUGUUCUCCGUCA GCGACC		54/55/56	
0077			AAAGTGCTCTGGGCTT GAGTTCCA	GUGUCCUGGGCUUGAG UUC	GAAUCUCAAAGCCCA GGACAC		57/58/59	

Tabla 8. (Nota: la secuencia del cebador de ARN efector y las secuencias del cebador de ARN antisentido mostradas en la tabla 8 fueron generadas con 2 residuos de timina en el extremo 3').

Muestra	Id sec	Id gen	Secuencia diana	directo	inverso	30 ppm	SEQ ID NO	
							diana/efectora/antisentido	Región
0075	ise1c.pk002. m13	Hormona juvenil problema	AACATGGTATCCGA CTTCAGGAA	CAUGGUAUCCGACTUUC AGG	CCTUGAAGTUCGGAU ACCAUG		51/52/53	
0076			AAGTCTGCTGACGA GAACAAGGA	GGUCGCTGACGAGAAC AAG	CUUGUUCUCGUCUA GGACC		54/55/56	
0077			AAGTCTCTGGGCT TGAGTTCCA	GUGUCCUGGGCUUGAG UUC	GAACUCAAGCCCA GGACAC		57/58/59	

Tabla 9. (Nota: la secuencia del cebador de ARN efector y las secuencias del cebador de ARN antisentido mostradas en la tabla 9 fueron generadas con 2 residuos de timina en el extremo 3').

Muestra	Id sec	Id gen	Secuencia diana	directo	inverso	30 ppm	15 ppm	8 ppm	SEQ ID NO
0075			AAGTCTGCTGACGA GAACAAGGA	GGUCGCGGACG AGAACAAAG	CUUGUUCUCGUCA GCGACC				Región diana/efectora/antisentido 51/52/53
0076			AAGTCTCTGGGCTT GAGTTCCA	GUGUCCUUGGC UUGAGUUC	GAACUCAAGCCCCA GGACAC	+			54/55/56
0077	ise1c.pk00 3.f7	Hormona juvenil problema	AAGAAGAAGCTCCT CCACGTGTT	GAAGAAGCUCC UCCACGUG	CACGUGGAGGAGC UUCUUC				57/58/59

Tabla 10

pocillo	Id sec	Intestino medio	Id gen	Mortalidad inyección (%)	Resultado alimentación Gotitas	Análisis tóxico 1 30 ppm	Análisis tóxico 2 30 ppm	Análisis tóxico 3 30 ppm	Análisis tóxico 4 30 ppm	Análisis tóxico 4 15 ppm	Análisis tóxico 4 8 ppm	Top. 5 15 ppm	Top. 5 8 ppm
77	iseic-pk002. ml3	no	Hormona juvenil problema	NT	NT	NT	.	.	+			+	

Tabla 13 Resumen de los datos de alimentación de gotitas para FAW para el primer conjunto de cebadores de ARNdh sintéticos

	Análisis N° 1 (tabla 6)	Análisis N° 2 (tabla 7)	Análisis N° 3 (tabla 8)	Análisis N° 4 (tabla 8)		
				30 ppm	15 ppm	8 ppm
0075	-	30 ppm	30 ppm	30 ppm	15 ppm	8 ppm
0076	NT	-	-	NT	-	-
0077	NT	-	-	-	-	-

Hormona juvenil problema

iseic.pk002.m13

Ejemplo 2. Transformación de maíz

5

Se bombardean embriones de maíz inmaduros de plantas donantes de invernadero con un plásmido que contiene el elemento silenciador de la invención conectado operablemente a un promotor específico del tejido, selectivo del tejido, o constitutivo y el gen marcador seleccionable PAT (Wohlleben et al. (1988) Gene 70:25-37), que confiere resistencia al herbicida Bialafos. En una realización, los constructos tendrán 2 segmentos de 2-300 pb idénticos del gen diana en orientaciones opuestas con un segmento del "intrón" entre ellos actuando como bucle en horquilla. Semejante constructo puede estar conectado al promotor dMMB. Alternativamente, se proporciona el gen marcador seleccionable sobre un plásmido separado. La transformación se lleva a cabo como sigue. A continuación se

describen recetas para los medios.

Preparación de tejido diana

5 Las espigas se descascarillan y la superficie se esteriliza en blanqueante Clorox al 30% más detergente Micro al 0,5% durante 20 minutos, y se enjuagan dos veces con agua estéril. Los embriones inmaduros se separan y se colocan con el eje embrionario hacia abajo (lado del escutelo hacia arriba), 25 embriones por placa, sobre medio 560Y durante 4 horas y después se alinean dentro de la zona diana de 2,5 cm como preparación para el bombardeo.

10 Se elabora un vector plasmídico que comprende el elemento silenciador de interés conectado operablemente a un promotor específico del tejido, selectivo para el tejido, o constitutivo. Este ADN plasmídico más el ADN plasmídico que contiene un marcador seleccionable PAT se hacen precipitar sobre gránulos de tungsteno de 1,1 μm (diámetro medio) utilizando un procedimiento de precipitación de CaCl_2 como sigue: 100 μl de partículas de tungsteno preparadas en agua; 10 μl (1 μg) de ADN en ampón Tris EDTA (1 μg de ADN total); 100 μl de CaCl_2 2,5 M; y, 10 μl de espermidina 0,1 M.

15 Cada reactivo se añade sucesivamente a la suspensión de partículas de tungsteno, mientras se mantiene sobre el mezclador de vórtice de múltiples tubos. La mezcla final se somete a sonicación brevemente y se deja incubar bajo vórtice constante durante 10 minutos. Después del período de precipitación, los tubos se centrifugan brevemente, se retira el líquido, se lavan con 500 ml de etanol del 100%, y se centrifugan durante 30 segundos. De nuevo se retira el líquido, y se añaden 105 μl de etanol del 100% a los gránulos de partículas de tungsteno finales. Para el bombardeo con pistola de partículas, las partículas de tungsteno/ADN se someten a sonicación brevemente y se aplican 10 μl sobre el centro de cada macroportador y se dejan secar durante aproximadamente 2 minutos antes del bombardeo.

20 Las placas de muestras se bombardean a nivel núm. 4 en una pistola de partículas. Todas las muestras reciben un único disparo a 44,24 atm, con un total de diez alícuotas tomadas de cada tubo de partículas/ADN preparado.

25 Después del bombardeo, los embriones se mantienen sobre medio 560Y durante 2 días, después se transfieren a medio de selección 560R que contiene 3 mg/litro de Bialafos, y se subcultivan cada 2 semanas. Después de aproximadamente 10 semanas de selección, los clones de callos resistentes a la selección se transfieren a medio 288J para iniciar la regeneración de la planta. Después de la maduración de los embriones somáticos (2-4 semanas), los embriones somáticos bien desarrollados se transfieren a medio para la germinación y se transfieren a una cámara de cultivo iluminada. Aproximadamente 7-10 días más tarde, las plántulas en desarrollo se transfieren a medio sin hormonas 272V en tubos durante 7-10 días hasta que las plántulas están bien establecidas. A continuación se transfieren las plantas a insertos en bandejas planas (equivalentes a tientos de 6,35 cm) que contienen tierra para macetas y se hacen crecer durante 1 semana en una cámara de crecimiento, con posterioridad se desarrollan 1-2 semanas más en un invernadero, después se transfieren a macetas de 600 clásicas (6,05 litros) y se hacen crecer hasta la madurez.

35 Las plantas se controlan y se puntúan en cuanto el marcador apropiado, tal como el control de Lepidoptera y tienen actividad insecticida. Por ejemplo, se pudo llevar a cabo un análisis de alimentación para FAW. En semejantes análisis, se escindieron discos foliares de la planta transgénica utilizando un sacabocados para corcho o un troquel para hojas de 1 cm. Se preparan seis discos foliares para cada planta. Las hojas se colocan en una placa de microtitulación de 24 pocillos sobre la parte superior de 500 μl de agar al 0,8%. Cada disco foliar es infestado con 2 cogolleros del maíz neonatos y la placa se sella después con Mylar. Se realiza un pequeño agujero de ventilación para cada pocillo y las placas se almacenan después en una cámara de crecimiento a 28°C. El análisis se puntúa en cuanto a la mortalidad, la atrofia, y el consumo foliar a las 96 horas.

45 El medio de bombardeo (560Y) comprende 4,0 g/l de sales basales N6 (SIGMA C-1416), 1,0 ml/l de Mezcla de Vitaminas de Eriksson (1000X SIGMA-1511), 0,5 mg/l de tiamina HCl, 120,0 g/l de sacarosa, 1,0 mg/l de 2,4-D, y 2,88 g/l de L-prolina (completado hasta el volumen con D-I H₂O después del ajuste a pH 5,8 con KOH); 2,0 g/l de Gelrite (añadido después de completar el volumen con D-I H₂O); y 8,5 mg/l de nitrato de plata (añadido después de esterilizar el medio y enfriar a la temperatura ambiente). El medio de selección (560R) comprende 4,0 g/l de sales basales N6 (SIGMA C-1416), 1,0 ml/l de Mezcla de Vitaminas de Eriksson (1000X SIGMA-1511), 0,5 mg/l de tiamina HCl, 30,0 g/l de sacarosa, y 2,0 mg/l de 2,4-D (completado hasta el volumen con D-I H₂O después del ajuste a pH 5,8 con KOH); 3,0 g/l de Gelrite (añadido después de completar el volumen con D-I H₂O); y 0,85 mg/l de nitrato de plata y 3,0 mg/l de bialafos (ambos añadidos después de esterilizar el medio y enfriar a la temperatura ambiente).

50 El medio de regeneración de las plantas (288J) comprende 4,3 g/l de sales MS (GIBCO 11117-074), 5,0 ml/l de disolución de partida de vitaminas MS (0,100 g de ácido nicotínico, 0,02 g/l de tiamina HCl, 0,10 g/l de piridoxina HCl, y 0,40 g/l de glicina completada hasta el volumen con D-I H₂O refinada) (Murashige y Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15:473), 100 mg/l de mioinositol, 0,5 mg/l de zeatina, 60 g/l de sacarosa, y 1,0 ml/l de ácido abscísico 0,1 mM (completado hasta el volumen con D-I H₂O refinada después de ajustar a pH 5,6); 3,0 g/l de Gelrite (añadido después de completar hasta el volumen con D-I H₂O); y 1,0 mg/l de ácido indolacético y 3,0 mg/l de bialafos (añadido después de esterilizar el medio y enfriar a 60°C). El medio libre de hormona (272V) comprende 4,3 g/l de sales MS (GIBCO 11117-074), 5,0 ml/l de disolución de partida de vitaminas MS (0,100 g/l de ácido nicotínico, 0,02 g/l de tiamina HCl, 0,10 g/l de piridoxina HCl, y 0,40 g/l de glicina completada hasta el volumen con D-I H₂O

refinada), 0,1 g/l de mioinositol, y 40,0 g/l de sacarosa (completada hasta el volumen con D-I H₂O refinada después de ajustar el pH a 5,6); y 6 g/l de bacto-agar (añadido después de completar el volumen con D-I H₂O refinada), se esteriliza y se enfría a 60°C.

Ejemplo 3. Transformación de maíz mediada por *Agrobacterium*

5 Para la transformación del maíz mediada por *Agrobacterium* con un elemento silenciador de la invención, se emplea el método de Zhao (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.981.840, y publicación de patente PCT WO 98/32326). Semejante constructo puede comprender 2 segmentos de 2-300 pb idénticos del gen diana en orientaciones opuestas con un segmento de "intrón" entre ellos actuando como bucle en horquilla. Semejante constructo puede estar conectado al promotor dMMB. Brevemente, los embriones inmaduros se aíslan del maíz y se ponen en contacto los embriones con una suspensión de *Agrobacterium*, donde las bacterias son capaces de transferir el polinucleótido que comprende el elemento silenciador a al menos una célula de al menos uno de los embriones inmaduros (etapa 1: la etapa de infección). En esta etapa los embriones inmaduros se sumergen en una suspensión de *Agrobacterium* para el inicio de la inoculación. Los embriones se cultivan simultáneamente durante un tiempo con *Agrobacterium* (etapa 2: etapa de cultivo simultáneo). Los embriones inmaduros se cultivan sobre un medio sólido después de la etapa de infección. Después de este período de cultivo simultáneo se contempla una etapa de "reposo" opcional. En esta etapa de reposo, los embriones se incuban en presencia de al menos un antibiótico que se sabe que inhibe el crecimiento de *Agrobacterium* sin la adición de un agente selectivo para los transformantes de las plantas (etapa 3: etapa de reposo). Los embriones inmaduros se cultivan sobre medio sólido con antibiótico, pero sin un agente de selección, para la eliminación de *Agrobacterium* y para una fase de reposo para las células infectadas. A continuación, los embriones inoculados se cultivan sobre un medio que contiene un agente selectivo y se recupera callo transformado en crecimiento (etapa 4: etapa de selección). Los embriones inmaduros se cultivan sobre medio sólido con un agente selectivo dando como resultado el crecimiento selectivo de las células transformadas. El callo se regenera después en plantas (etapa 5: etapa de regeneración), y los callos desarrollados sobre medio selectivo se cultivan sobre medio sólido para regenerar las plantas.

25 Ejemplo 4: Transformación de embriones de soja

Condiciones de cultivo

Los cultivos en suspensión embriogénicos de soja (cv. Jack) se mantienen en 35 ml de medio líquido SB 196 véanse las recetas más abajo) en un aparato de sacudimiento giratorio, 150 rpm, 26°C con luces fluorescentes blancas frías en un fotoperíodo de día/noche de 16:8 hr a una intensidad de luz de 60-85 µE/m²/s. Los cultivos se subcultivan cada 7 días a dos semanas inoculando aproximadamente 35 mg de tejido en 35 ml de SB196 líquido de nueva aportación (el intervalo de subcultivo preferido es cada 7 días).

Los cultivos en suspensión embriogénicos de soja se transforman con los plásmidos y fragmentos de ADN descritos en los ejemplos anteriores mediante el método de bombardeo con pistola de partículas (Klein et al. (1987) Nature, 327:70).

35 Inicio del cultivo en suspensión embriogénico de soja

Los cultivos de soja se inician dos veces cada mes con 5-7 días entre cada inicio.

Se escogieron vainas con semillas inmaduras de plantas de soja disponibles 45-55 días después de la plantación, se sacaron de sus cubiertas y se colocaron en una caja de color magenta esterilizada. Las semillas de soja se esterilizan sacudiéndolas durante 15 minutos en una disolución de Clorox al 5% con una gota de jabón de marfil (95 ml de agua destilada sometida a autoclave más 5 ml de Clorox y 1 gota de jabón). Se mezclan bien. Las semillas se enjuagan utilizando 2 botellas de 1 litro de agua destilada estéril y aquellas de menos de 4 mm se colocan sobre portaobjetos de microscopio individuales. El extremo pequeño de la semilla se corta y los cotiledones se sacan a presión de la envoltura de la semilla. Los cotiledones se transfieren a placas que contienen medio SB1 (25-30 cotiledones por placa). Las placas se envuelven con cinta de fibra y se almacenan durante 8 semanas. Después de este tiempo, los embriones secundarios se cortan y se colocan en medio líquido SB196 durante 7 días.

Preparación de ADN para el bombardeo

Se utiliza o bien un plásmido intacto o bien un fragmento de ADN plasmídico que contiene los genes de interés y el gen marcador seleccionable para el bombardeo. El ADN plasmídico para el bombardeo se prepara y se purifica rutinariamente utilizando el método descrito en Promega™ Protocols and Applications Guide, Segunda Edición (página 106). Los fragmentos de los plásmidos que portan el elemento silenciador de interés se obtienen mediante aislamiento en gel de plásmidos doblemente digeridos. En cada caso, se digieren 100 µg de ADN plasmídico en 0,5 ml de la mezcla de enzimas específica que es apropiada para el plásmido de interés. Los fragmentos de ADN resultantes se separan mediante electroforesis en gel sobre agarosa SeaPlaque GTG al 1% (BioWhitaker Molecular Applications) y los fragmentos de ADN que contienen el elemento silenciador de interés se cortan del gel de agarosa. El ADN se purifica de la agarosa utilizando la GELasa que digiere la enzima siguiendo el protocolo del fabricante.

5 Se añade una alícuota de 50 µl de agua estéril que contiene 3 mg de partículas de oro (3 mg de oro) a 5 µl de una disolución de ADN de 1 µg/µl (plásmido intacto o fragmento de ADN preparado como se ha descrito anteriormente), 50 µl de CaCl₂ 2,5 M y 20 µl de espermidina 0,1 M. La mezcla se sacude 3 minutos al nivel 3 del mezclador de vórtice y se centrifuga durante 10 seg en una microcentrífuga de mesa. Después de un lavado con 400 µl de etanol del 100% el sedimento se suspende mediante sonicación en 40 µl de etanol del 100%. Se dispensan 5 µl de la suspensión de ADN en cada disco giratorio del disco del aparato Biolistic PDS1000/HE. Cada alícuota de 5 µl contiene aproximadamente 0,375 mg de oro por bombardeo (esto es, por disco).

Preparación de tejido y bombardeo con ADN

10 Se colocan aproximadamente 150-200 mg de los cultivos en suspensión embrionarios de 7 días en una placa de petri de 60 x 15 mm estéril, vacía y la placa se cubre con malla de plástico. El tejido se bombardea con 1 o 2 disparos por placa con una presión de ruptura de la membrana ajustada a 74,86 atm y la cámara se evacua a un vacío de 685,80-711,20 mm de mercurio. El tejido se coloca a aproximadamente 88,90 mm de la pantalla de retención/parada.

Selección de embriones transformados

15 Los embriones transformados se seleccionaron utilizando o bien higromicina (cuando se utilizó el gen de la higromicina fosfotransferasa, HPT, como marcador seleccionable) o bien clorsulfuron (cuando se utilizó el gen de la acetolactato sintasa, ALS, como marcador seleccionable).

Selección con higromicina (HPT)

20 Después del bombardeo, el tejido se coloca en medio SB 196 de nueva aportación y se cultiva como se ha descrito anteriormente. Seis días después del bombardeo, se cambia el SB196 por SB196 de nueva aportación que contiene agente de selección de 30 mg/L de Higromicina. El medio de selección se renueva semanalmente. De cuatro a seis semanas después de la selección, se puede observar tejido transformado, verde creciendo a partir de las agrupaciones embriogénicas necróticas, no transformadas. El tejido verde, aislado se retira y se inocula en placas de múltiples pocillos para generar cultivos en suspensión embriogénicos transformados, propagados clonalmente, nuevos.

Selección con clorsulfuron (ALS)

30 Después del bombardeo, el tejido se divide entre 2 matraces con medio SB 196 de nueva aportación y se cultiva como se ha descrito anteriormente. De seis a siete días después del bombardeo, se cambia el SB196 por SB196 de nueva aportación que contiene agente de selección de 100 ng/ml de Clorsulfurón. El medio de selección se renueva semanalmente. De cuatro a seis semanas después de la selección, se puede observar tejido transformado, verde creciendo a partir de las agrupaciones embriogénicas necróticas, no transformadas. El tejido verde, aislado se retira y se inocula en placas de múltiples pocillos que contienen SB196 para generar cultivos en suspensión embriogénicos transformados, propagados clonalmente, nuevos.

Regeneración de embriones somáticos de soja en plantas

35 Con el fin de obtener plantas completas a partir de los cultivos en suspensión embriogénicos, se debe regenerar el tejido.

Maduración de embriones

40 Los embriones se cultivan durante 4-6 semanas a 26°C en SB196 bajo bombillas (40 watt) fluorescentes blancas frías (Phillips cool white Econowatt F40/CW/RS/EW) y Agro (Phillips F40 Agro) en un fotoperíodo de 16:8 hr con una intensidad de luz de 90-120 µE/m²s. Después de este tiempo las agrupaciones de embriones se retiran a un medio de agar sólido, SB 166, durante 1-2 semanas. Las agrupaciones se subcultivan después en medio SB103 durante 3 semanas. Durante este período, se pueden retirar los embriones individuales de las agrupaciones y escrutarlos para determinar el marcador apropiado o la capacidad de la planta, cuando se inyecta con los elementos silenciadores, para controlar el Lepidóptero.

Desecación y germinación de embriones

50 Los embriones individuales madurados se desecan colocándolos en una placa petri pequeña, vacía (35 x 10 mm) durante aproximadamente 4-7 días. Las placas se sellan con cinta de fibra (creando una pequeña cámara de humedad). Los embriones desecados se plantan en medio SB71-4 en el que se dejan germinar en las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente. Las plántulas germinadas se retiran del medio de germinación y se enjuagan cuidadosamente con agua y a continuación se plantan en Redi-Earth en una bandeja Cell pack de 24 alveolos, cubierta con una bóveda de plástico transparente. Después de 2 semanas la bóveda se retira y las plantas se fortalecen durante una semana más. Si las plántulas parecen robustas se transplantan a tiestos de 25,40 cm de Redi-Earth hasta con 3 plántulas por tiesto.

Recetas de medios

ES 2 429 938 T3

Medio para la proliferación líquida SB 196 - FN Lite (por litro) -	
MS FeEDTA - 100x Disolución de partida 1	10 ml
MS Sulfato - 100x Disolución de partida 2	10 ml
FN Lite Haluros - 100x Disolución de partida 3	10 ml
FN Lite P,B,Mo - 100x Disolución de partida 4	10 ml
Vitaminas B5 (1 ml/L)	1,0 ml
2,4-D (10 mg/L concentración final)	1,0 ml
KNO ₃	2,83 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,463 g
Aspargina	1,0 g
Sacarosa (1%)	10 g
pH 5,8	

Disoluciones de partida FN Lite

Disolución de partida número		1000 ml	500 ml
1	MS Fe EDTA 100x Disolución de partida		
	Na ₂ EDTA*	3,724 g	1,862 g
	FeSO ₄ - 7H ₂ O	2,784 g	1,392 g
	* Añadir primero, disolver en una botella oscura mientras se agita		
2	MS Sulfato 100x disolución de partida		
	MgSO ₄ - 7H ₂ O	37,0 g	18,5 g
	MnSO ₄ -H ₂ O	1,69 g	0,845 g
	ZnSO ₄ - 7H ₂ O	0,86 g	0,43 g
	CuSO ₄ - 5H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g
3	FN Lite Haluros 100x Disolución de partida		
	CaCl ₂ - 2H ₂ O	30,0 g	15,0 g
	KI	0,083 g	0,0715 g
	CoCl ₂ - 6H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g
4	FN Lite P,B,Mo 100x Disolución de partida		
	KH ₂ PO ₄	18,5 g	9,25 g
	H ₃ BO ₃	0,62 g	0,31 g
	Na ₂ MoO ₄ - 2H ₂ O	0,025 g	0,0125 g

Medio sólido SB1 (por litro) comprende: 1 pkg. Sales MS (Gibco/BRL - Núm. Cat. 11117-066); 1 ml de Vitaminas B5 1000X disolución de partida; 31,5 g de sacarosa; 2 ml de 2,4-D (20 mg/L concentración final); pH 5,7; y, 8 g de agar TC.

- 5 Medio sólido SB 166 (por litro) comprende: 1 pkg. Sales MS (Gibco/BRL - Núm. Cat. 11117-066); 1 ml de Vitaminas B5 1000X disolución de partida; 60 g de maltosa; 750 mg de MgCl₂ hexahidrato; 5 g de carbón activado; pH 5,7; y, 2 g de gelrite.

Medio sólido SB 103 (por litro) comprende: 1 pkg. Sales MS (Gibco/BRL - Núm. Cat. 11117-066); 1 ml de Vitaminas B5 1000X disolución de partida; 60 g de maltosa; 750 mg de MgCl₂ hexahidrato; pH 5,7; y, 2 g de gelrite.

- 10 Medio sólido SB 71-4 (por litro) comprende: 1 botella de sales B5 de Gamborg w/ sacarosa (Gibco/BRL - Núm. Cat. 21153-036); pH 5,7; y, 5 g de agar TC.

La disolución de partida 2,4-D se obtiene pre-elaborada de Phytotech núm. cat. D 295 - la concentración es de 1

mg/ml.

5 La disolución de partida de vitaminas B5 (por 100 ml) que se almacena en alícuotas a -20C comprende: 10 g de mioinositol; 100 mg de ácido nicotínico; 100 mg de piridoxina HCl; y, 1 g de tiamina. Si la disolución no se disuelve suficientemente deprisa, aplicar un bajo nivel de calor a través de la placa de agitación caliente. La disolución de partida de Clorsulfuron comprende 1 mg/ml en Hidróxido de amonio 0,01 N.

El artículo "un", "uno" y "una" se utilizan en la presente memoria para hacer referencia a uno o más de uno (esto es, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" representa uno o más elementos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC. & E. I. DuPONT DE NEMOURS & COMPANYY
- <120> Composiciones y métodos para la supresión de polinucleótidos diana de Lepidoptera
- <130> 2163-PCT
- 5 <150> 12/351.267
- <151> 09-01-2009
- <150> 61/021.699
- <151> 17-01-2008
- 10 <150> 61/021.676
- <151> 17-01-2008
- <160> 452
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 540
- 15 <212> ADN
- <213> Spodoptera frugiperda
- <220>
- <221> característica_miscelánea
- <222> 417, 423, 500, 524, 540
- 20 <223> n = A,T,C o G
- <400> 1
- caagcatcca acatggtatc cgacttcagg aagaagaagc tcctccacgt gttcaagtcc 60**
- ttcttcgaca cggacggcag cggcaacatc gagaaggatg acttcctgat ggccatcgaa 120**
- aggataacca agaccagagg ctggaaagct ggagacgaca aatacaaatt tgtcgaggag 180**
- accctattga agatctggga cggcatccag aaggtcgctg acgagaacaa ggacggacag 240**
- gtcagccagg acgagtggat cgctatgtgg gacaagtact ccaagaaccc gtccgaggcg 300**
- ttcgagtggc agaccctgta ctgcaagttc gcgttcactc ttgaagacgc cagcgacgat 360**
- ggatccatcg acagcgagga gttctcctct gtgtacgcct ccttcggcct ggacaangac 420**
- gangctgtgg ctgccttcaa gaaagatggc taacggtaag tccgaagtgt cctgggcttg 480**
- agttccacga cctgtggaan gagtacttct catccggaag actngaacgc tgccgggaan 540**
- <210> 2
- <211> 505
- 25 <212> ADN
- <213> Spodoptera frugiperda
- <220>
- <221> característica_miscelánea
- <222> 358, 410, 442, 482
- 30 <223> n = A,T,C o G
- <400> 2
- ccaacatggt atccgacttc aggaagaaga agctcctcca cgtggttcaag tccttcttcg 60**
- acacggacgg cagcggcaac atcgagaagg atgatttcct gatggccatc gaaaggataa 120**
- ccaagaccag aggctggaaa gctggagaca acaaatataa atttgtcgag gaaaccctat 180**
- tgaagatctg ggacggcatc cagaaggctg ctgacgagaa caaggacgga caggtcagcc 240**
- aggacgagtg gatcgctatg tgggacaagt actccaagaa cccatccgag gcgttcgagt 300**
- ggcagaccct gtactgcaag ttcgcgttca ctcttgaaga cgccagcgac gacggatnca 360**
- tcgacagcga agagttctcc tctgtgtacg cctccttcgg gctggacaan ggacgaggcg 420**
- gtggctgcct tcaagaagat gntaacggta agtccgaatg tcctggggct gaggtttcaag 480**
- anctgttggg aggatacttc tcaac 505**

<210> 3
 <211> 410
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

5 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 271, 346
 <223> n = A,T,C o G

<400> 3
caacatggta tccgacttca ggaagaataa gctcctccac gtgttcaagt ccttcttcga 60
cacggacggc agcggcaaca tgcgagaagga tgacttcctg atggccatcg aaaggataac 120
caagaccaga ggctggaaag ctggagacga caatacaaa tttgtcgagg agaccctatt 180
gaagatctgg gacggcatcc agaaggtcgc tgacgagaac aaggacggac aggtcagcca 240
ggacgagtgg atcgctatgt gggacaagta ntccaagaac ccgtccgagg cgttcgagtg 300
gcagaccctg tactgcaagt tcgcttcac tcttgaagac gccagngacg atggatccat 360
 10 **cgacagcgag gagtctcct ctgtgtacgc ctccctcggc ctggacaagg 410**

<210> 4
 <211> 445
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 66, 72, 264, 329, 358, 404, 406, 413, 427, 443
 <223> n = A,T,C o G

<400> 4
gagagagaga gagagagaga actagtctcg agtttttttt tttttttttt tttttttttt 60
tttttnggaa antactatth tattgtacca actgcccctt aacctcatct atgagtcacc 120
cataaatggt attttggtaa aatgtttgac aacttcaca ctaatattta taaatgtgaa 180
agtttgtttg tttgaatggt tgtatatttg tctgtcaatc acgctgaaac cactgtatag 240
aatttgacct aatttggat acanacaggg tatgagctga cttgggtgat aggatacttt 300
ttatcccaca ggaacgcggg taaagtccnt gggcagaagc tagtatgtaa taattatntc 360
cctctaccta ccctatatgg ggggtggaccg tcatgttctt tacncnacia ccngtttgtc 420
 20 **cacctcncct ttaaagtttt gtnag 445**

<210> 5
 <211> 672
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

25 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 670, 671, 672
 <223> n = A,T,C o G

<400> 5
gcacgagggc cgtgtcgact tcgcaccagt cccctattta tttaccttga caaaaatatg 60
gcgcgcctat tgtttattgc gcctatcctg gcggtggcta taatgccagt atacttctta 120
ttcctaaagg gaccaccccc actaccgaa ctagatatga acgagtgggt gggcccagag 180
aagctaaaag caaaacctga cactagtata aaacccttta aaattgcttt tggagacact 240
gttgtaaaag acttaaaaga ccgtctcaa cgttctcggc ctttcaactgc tccgctggag 300
ggtgtggcat tccagtacgg cttcaacact gctcagctgg atggttggct gaagtactgg 360
gctaagtagt ataagttcaa ggagagagag accttcctca accagtagcc tcagtacaaa 420
accaatatcc agggctcttga catccacttc atcagggtta caccgaaggt accggcagga 480
gtggaggtgg taccatgct actcctccac ggctggccag gctctgtcag ggagttctac 540
gaggctattc ctctcatcac agcagtcagc aaggaccgtg acttcgctgt ggaagtcatc 600
gttccaagtc tacctggcta tggattctct gatgccgcag ttcgtcccgg cnnnnnnncc 660
 30 **ccacaaatgn nn 672**

<210> 6
 <211> 693
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

5 <400> 6

```
gcacgaggct tggacgtgat gttacctggg aattcaaccc cttgaatggt aaggctcggct 60
cccacatcac cggaggagac ttgtacggt tctgtacacga gaacacattg gttaagcaca 120
agatgttgat cccacccaag gccaaaggta ccgtcaccta cgtcgcgccc tccggcaact 180
acaaagtac tgacgtagt ttggagacgg agttcgcgag cgagaaggag aagtacacca 240
tgttgcaagt atggccgggtg cgcagccgc gccccgtcac tgagaagctg tccgccaacc 300
accccctgct caccggacag agagtgtctg actctctctt cccttgtgtc cagggtggta 360
ccacggccat ccccggcgcc ttcggttgtg gcaagactgt cgtctcacag gctctgtcca 420
agtactccaa ctctgacgtc atcatctacg tccgatgcgg tgaacgtggt aacgagatgt 480
ctgaggtact gcgtgacttc cccgagctga cgggtggagat cgagggcatg accgagtcca 540
tcatgaagcg taccgcgctc gtcgccaaca cctccaacat gcctgtagcc gcccgagagg 600
cttccatcta caccggtatc accctctccg agtacttccg tgacatgggt tacaacgtgt 660
ccatgatggc tgactccacc tctcgttggg ccg 693
```

<210> 7
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

10

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 39, 40, 41, 162, 164, 166, 167, 168, 169, 242, 268, 269, 270, 293, 294, 295, 299, 300
 <223> n = A,T,C o G

15 <400> 7

```
gcacgaggca gatagtcatc actgtttttg ggacctgtnn ntactccctc aataaaccta 60
caaaatggcc gaaaacccaa tctacggacc cttctttgga gttatggggg cggcgtctgc 120
tatcatcttt agcgcgctgg gagctgccta tggaaactgct angncnnna ccggtatcgc 180
cgccatgtcg gtgatgcggc ccgagctcat catgaagtc aacaactaca ccctttacaa 240
gnggttcatc caccttggcg ctggtctnnn cgtaagtttc tccggtctag cgnnnggcnn 300
```

<210> 8
 <211> 688
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

20

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 318, 319, 320, 321, 658, 659, 660, 661, 662, 686, 687, 688
 <223> n = A,T,C o G

25 <400> 8

```
gcacgaggct cacaggctct gtccaagtac tccaactctg acgtcatcat ctacgtcggg 60
tgcggtgaac gtggtaacga gatgtctgag gtactgctg acttcccga gctgacgggt 120
gagatcgagg gcatgaccga gtccatcatg aagcgtaccg cgtcgcgcgc caacacctcc 180
aacatgcctg tagccgcccg agaggcttcc atctacaccg gtatcaccct ctccgagtac 240
ttccgtgaca tgggttacia cgtgtccatg atggctgact ccacctctcg ttgggcccag 300
gctcttcgtg agatctcnnn ncgtctggct gagatgcctg ccgactcggg ttaccccgcc 360
tacctgggag cccgtctggc ctcgttctac gagcgtgccg gacgtgtgaa gtgcttgggt 420
aaccgacaca gggagggtc cgtgtccatc gtgggcgccg tgcgcgccgc cggaggtgac 480
ttctccgacc ccgtgacggc cgccacgctg ggtatcgtgc aggtgttctg ggggttgag 540
aagaagctcg cgcagcgcaa gcaattccc gccatcaact ggctcatctc ctacagcaag 600
tacatgocgag cgctggacga cttctatgag aagaactacc ccgagttcgt gccctcnnn 660
nncagggtc aaggagatcc tgcagann 688
```

<210> 9
 <211> 685
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

5 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 674, 675
 <223> n = A,T,C o G

<400> 9

```

gcacgaggtg tctaaaacag tgcgtcgtaa tatattcaag atgtctcgtc ttaggttttg 60
ttttttatta gcagtactat gcagttgttt gcagaatggt tacggtttta caacagaaaa 120
gccagttacc cagcatgtag atcctaaacc agaagttcct gaaacggtgc ctgaaacaac 180
acgagtgcct gcgccgagct cgtcgacggc agcgcggacc acaccagctc cgacaccggc 240
accaacgcca gcaccacac cagctcctac accagctcct actccagctc ctacccttgc 300
gcctactcct gcgcctactc ctgcgcctac tcctgcgcct acccccgcac ctacaccagc 360
gcccactcct gctcccaccc cagctcccct ccccgcctcc gaccaaggca catggtcctt 420
cactgatgaa aaggccaatc agacatgcat tgtggcccaa ttcgcagccc aactgaatgt 480
cacatacacc aagttagtgg agaatgcaac gtctctatcg tacgtgaggg tcaacgtgcc 540
cgcgaacgcg tcggtcctca acggcagctg ttcggacccc gaccaatgga tccagatcac 600
ctggaagacc aacgacgaca gcgagacgaa caacacatg accctcgtgt acaacaagaa 660
10 tgccaccacc aagnnctacg gcctg                                     685
    
```

<210> 10
 <211> 612
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 558, 560, 573, 574, 575, 589, 590, 591, 592, 593, 595, 596, 597, 599, 604, 605, 612
 <223> n = A,T,C o G

<400> 10

```

gcacgagggc ggtttgaagt gatctagttc gtcagaaaaa acacagacca cgttcacaat 60
gaaatcgatg gtggtggtat tcgctgtgtg cgccgtggcg tgcggctccc tgggtgccgct 120
ggcgcagcct cctcatcacc ccgccgtcgt gctggaccgg cacggccggc cgctcgacac 180
cgccgaggtg atcaacgccc gcgccctcca cctgcaggct aaggccctgg atggacacta 240
cgctcccctc gcgcacgctg ccgtcgtgcc tgttgcccac tccgtggtag ccgccccgcg 300
tgtggtcgcc gctcccggcg ccgtgtccca ccagtcccgt gtggatgtgc gcaccagccc 360
cgccatcgtg agccacgccc tcgctgctcc cgtagtagcc cacgggtgtct actccgctcc 420
cctgctggcc cactccgctc tcggctacgc cggtcacgga cactacctga agaagcgctc 480
cctgggacac ctgcctacg ccgctcccgt cgtcgcccac gtagctccct ccgcggtgtc 540
gcaccagtc cgcgtggnen tcgtctccag cennnctgtc gtgtctcann nnntnnntnc 600
20 cgtntgtccc cn                                     612
    
```

<210> 11
 <211> 550
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

25 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 460, 461, 485, 486, 487, 488, 489, 499, 501, 527, 528, 529, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542
 <223> n = A,T,C o G

<400> 11

gcacgagggg acgttgaacg aaagaaaatg ctacgcgtta cgatttttagc cgcagtggtg 60
 gtgttcgcct cagggcgcgc ccagaacaac ttcatcttca agaatgacat cactcctgag 120
 gaagcccagc agtacctcaa acaactgccg ttcacctcac cccagctctc tggacgcacc 180
 gctgtactgc ctctggttcg ctacgacgac cccaggtttc gttcagctga agctggccca 240
 acccttggac actactggaa gaatggacag gagatccaga acacagagga ctacttagaa 300
 gaggtctaca acgcggtca ataccacggc caggacggtc ttggcaacta cgcctacggt 360
 tatgagaccc ctgaatcttc caaggttgag aaccgtgaag gttccggagt cgtccaagga 420
 tcctatgtgt accaggttcc cggaatgaag gatctcgtcn nggtccgtta ctgggctgac 480
 agccnnnnnt tccaccagna ngacaatctt cccaaggttg aactgannnc cgctnnnnnn 540
 nncccgtct 550

5 <210> 12
 <211> 687
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 286, 287, 288, 632, 633, 634, 635, 636
 <223> n = A,T,C o G

<400> 12

gcacgaggtg tcaactcctga ccgtatctaa aactcggcac acaacacaat ggctgacatc 60
 gaagatacac atttcgagac cggggactcc ggtgcctccg ccaccttccc tatgcaatgc 120
 tcggccctgc gcaagaacgg tttcgtcatg ctttaagggtc gccctgcaa aatcgtcgag 180
 atgtccactt caaaaaccgg aaagcacggc cacgctaaag ttcacttggg tggaatcgat 240
 atttttaacg gcaagaaata cgaagatata tgcccttcca cccacnnnca tggacgtgcc 300
 ccacgtgaag cgtgaggact accagctcac cgatatctct gacgacggct acctaccct 360
 catggctgac aacggcgatc tccgcgagga cctcaagatc ccagacgggtg acctcggcac 420
 ccagttgcgt tctgacttcg atagcggcaa agagctggtg tgcactgtgc tgaagtcttg 480
 cggtgaggag tgtgtaatcg cagtcaaggc aaacacagct ctcgacaaat aaaccaactc 540
 agcatttata gggatataca tacatataat ttttttacia tcaacagctc ttacataaat 600
 gtaaacata atactatgta taatttaaca tnnnnnatta tgggtgtgacg cgggtgctggc 660
 ttgtcgcctg ccaactccacc cccgaag 687

15 <210> 13
 <211> 514
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

20 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 486, 487, 488, 510, 511, 512, 513, 514
 <223> n = A,T,C o G

<400> 13

gcacgagggc cgattgtaac atgtcgtatt caccagaaag aagatcagaa gattggccgg 60
 aagattccaa aatggccccg tctaaggatc aaggcaacta tgatgggcct ccaggaatgg 120
 aacccaagg ggcacttgat acaactggc accaggtcgt ggaaagcttt gacgacatga 180
 atctgaagga agaattggtg agaggaattt atgcttacgg ttttgaaaag ccgtctgcta 240
 tccaacaacg cgctattatg ccttgcattc aaggccgtga tgtcatagct caagcccagt 300
 ctgggtactgg gaagactgct accttctcta tttcaattct tcagcaaact gataccagta 360
 ttcgtgaatg ccaagcactg attttggccc ctactagaga gctggctcag cagatccaaa 420
 aggtggtgat tgctcttggg gatcacttga atgctaaatg ccatgcttgc atcggcggca 480
 ctaatnnngc gcgaagatgt tcgtcagctn nnnn 514

25 <210> 14
 <211> 636
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 635, 636
 <223> n = A,T,C o G

5 <400> 14

```
gcacgagggt cgtattcacc agaaagaaga tcagaagatt ggccggaaga ttccaaaaat 60
ggcccgtcta aggatcaagg caactatgat gggcctccag gaatggaacc ccaaggggca 120
cttgatacaa actggcacca ggtcgtggaa agcttcgacg acatgaatct gaaggaagaa 180
ttgttgagag gaatttatgc ttacggtttt gaaaagccgt ctgctatcca acaacgcgct 240
attatgcctt gcattcaagg ccgtgatgtc atagctcaag cccagtctgg tactgggaag 300
actgctacct tctctatttc aattcttcag caaatcgata ccagtattcg tgaatgccaa 360
gcactgattt tggcccctac tagagagctg gctcagcaga tccaaaaggt ggtgattgct 420
cttggggatc acttgaatgc taaatgccat gcttgcacg gcggcactaa tgtgcgcgaa 480
gatgttcgtc agctggagag tgggtgcat gtgggtggtg gtacacctgg tcgctgttac 540
gacatgataa ctcgctcgtc tctccgtgct aacactatca agctgtttgt acttgatgaa 600
gctgatgaaa tgctgtcaag aggatttaa gatcnn 636
```

<210> 15
 <211> 592
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

10

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 578, 579, 580, 583, 584, 585
 <223> n = A,T,C o G

15

<400> 15

```
gcacgagggt gatgtcacac ttgcaagaga ctggtcaaca ttcagaccg agcactcaga 60
ttttgtacaa tcgtactatg gccaccatcc tgtcacacat ctaccaccac gccctgcacg 120
ataactgggt ccaagctcga gacttgctct atctaggttt gtgcgctttt cgaaggggca 180
atgttaaaga agcccatggc tgcctagctg aactgatgat gactggcaaa cccaaggaac 240
tgttagctca aggtctgcta cctcagcgtc aacacgagcg ttcaaaggaa caggaaaaga 300
tagagaagca acgccaaatg ccgttccaca tgcacatcaa cttggaactg cttgaatgtg 360
tgtatttagt gtctgccatg ctgattgaaa ttccatacat ggccgcccac gaattcgatg 420
ctcgccggcg catgattagt aagactttct atcagaattt gcgcgcaagt gagcgtcagg 480
ctttggtagg cccgcccga tccatgcgtg agcatgctgt ggctgccgcc agggcgatgc 540
gccgcggaga ctggcgtgct tgcctcaatt ttattgtnnn tgnnnaatga at 592
```

<210> 16
 <211> 609
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

20

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 448, 449, 450, 452, 595, 596, 597, 598, 599
 <223> n = A,T,C o G

25

<400> 16

```
gcacgaggct gatagccacc tgccaaatta tcttgaata taaccattca ctaaaatatt 60
taacgtaatt tagtggtaa ttctaaactt aatcatggac gacgacatgg tatttgatcc 120
atctttaaag aaaaagaaga agaagaagac cggtttcgac ttagatgccg ctctcgcagg 180
cgaacaaggt gagagcacga gcgtggaggc gcccgctggg tcgggtgacg tcgacttgcc 240
tgaggatgat aacctcgatt tggataattt tggaaagaaa aagaagaaga agaagaaggg 300
agtcttcaac atggaagaac ttgaaagtac gttaccgaa acacctccgg ccgaagagcc 360
ggaacagcag gaggacgaag ttattgacga ttagatcta gatattgact tctctaaaac 420
gaaaaagaag aagaagaaga aaaacatnnn angagctcgt ccttgaagat gacaccaagg 480
gagaagatca agagaatgtc gaggatgta gtggtgattt atggagcggc acagaccgtg 540
actacacgta cgacgagcta ctagagcgag tgttcgacat catgcgagaa aagannnna 600
gcatggttt 609
```

<210> 17
 <211> 639
 <212> ADN

5 <213> Spodoptera frugiperda

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 511, 512, 614, 616, 618, 628, 631, 635, 636, 637, 638
 <223> n = A,T,C o G

10 <400> 17

```
gcacgaggca gattcatatt tccatcgctt attcgttgct gagaaaaatc gtcggtttta 60
gcgacgtaac atattgctaa taagtgtgaa atattgtgat aaacttcctt ttagcattag 120
ttaatctagt tcaattttaa ataattcaaa atgtttatct tggattgggt cactgggtgtt 180
ctcggattcc ttggtctgtg gaagaaatca ggcaagctac tgttcctggg actggacaat 240
gctggcaaga ccacactcct gcacatgctg aaggatgaca gattggcgca gcatgtacc 300
acattgcatc ccacgtcgga ggaactgtca ataggcagta tgcgtttcac gacgttcgac 360
ttgggcgggc atcagcaggc gcggcgcgtg tggcgcgact acttcccggc ggtggacgcc 420
atcgtgttcc tgggtggacgc gtgocgaccgc ccgocctgc ccgagtcaa ggccgagctg 480
gactcgtgct tcaactgacga gacgctcagc nnactgccc gtgctcatcc tcggcaacaa 540
gatcgacaag cccggcgcag ctagtgagga cgagctccgt cagttcttca acctgtacca 600
acagaccact gganangnca aagtatcnag ntcannnt 639
```

<210> 18
 <211> 574
 <212> ADN

15 <213> Spodoptera frugiperda

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 72, 73, 74, 190, 191, 192, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574
 <223> n = A,T,C o G

20 <400> 18

```
gcacgagggt ctatctcgga tattacacgt ggattgtaat ccgtgactaa ccaaaaatgg 60
gcaaggaaaa gnnncacatt aacattgtcg tcattggaca cgtcgactcc ggcaagtcca 120
ccaccaccgg tcaattgatc taaaaatgcg gtggtatcga caaacgtacc atcgagaagt 180
tcgagaaggn ncccaggaa atgggtaag ggttccttca aatagcctg ggtattggac 240
aaactgaagg ctgagcgtga acgtggtatc accatcgata ttgctctgtg gaagttcgaa 300
accgctaaat actatgtcac catcattgac gctcccggac acagagattt catcaagaac 360
atgatcactg gaacttccca ggctgattgc gccgtactca ttgtcgccgc tggtagccgg 420
gagttcgagg ctggtatctc gaagaacgga cagaccctgt agcacgctct gctcgtttc 480
acactcgggt tcaagcagct gattgtgggc gtcaacaaaa tggactccac tgagcccca 540
tacagcgaat cccgtttcga ggaatcnnn nnnn 574
```

<210> 19
 <211> 169
 <212> ADN

25

<213> Spodoptera frugiperda

<220>

<221> característica_misclánea

<222> 64, 153, 154, 155, 165, 166, 167, 168, 169

5 <223> n = A,T,C o G

<400> 19

gcacgaggcg gatattacac gtggattgta atccgtgact aaccaaaaat gggcaaggaa 60
aagnttcaca ttaacattgt cgtcattgga cacgtcgact cgggcaagtc caccaccacc 120
ggtcacttga tctacaaatg cggtggtatc gannnacgta ccatnnnnn 169

<210> 20

<211> 690

10 <212> ADN

<213> Spodoptera frugiperda

<220>

<221> característica_misclánea

15 <222> 505, 506, 507, 508, 510, 511, 512, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 592, 593, 594, 595, 678, 679, 680, 682, 683, 684

<223> n = A,T,C o G

<400> 20

gcacgaggct ctagtcccgct caccgctcgcc agtagggggc gccacaagaa cagaaagaga 60
attatttcaa actccaatta taacctacta gataactcca aaagttctgt cagttctaac 120
tttaatttaa cggggacgct agagtttatg gataggaccg ataagataat atcggacgcg 180
actgagctac aagcaatgca gaactttatc atggagaaga ttacgaaat ggaacctaat 240
gagaagaaga agcaatctga ggtcgacagg gtattcaaac acgcattatt agaattcaaa 300
gacaatttag tagcgacgta cagcatagtg gagacgcggg gctctgcgct gaagtacaag 360
gatctgatcg gcaacttcct gcacgctcatg gagacggttt gtgccagggg ggggtccacg 420
ctctccatca ccatgggggt caacgccttt aggggtttca tggacgagtt tatgagccaa 480
catgacactg ataaagctag gacgnnnngn nnaaggataa aaagannnnn ntggacgatc 540
caatacaata caaaggccat acgttcatac tgtccatgat caacatacca annnnagtgt 600
gagatctgca agactttctt catgtggccc atagagcggg cactcatatg ccagacggtgt 660
aaacttgccct cgcataannn tnnnacacta 690

20 <210> 21

<211> 711

<212> ADN

<213> Spodoptera frugiperda

<220>

25 <221> característica_misclánea

<222> 612, 613, 614, 663, 664, 665, 667, 668, 701, 706, 707, 708, 709, 710, 711

<223> n = A,T,C o G

<400> 21

tgactccaca gtgggacaaa ctcatagagc ttgatgtgtg gtacgctgct gtgaccceaag 60
tgttcttctc tctgtctgtg tgcaccggtg ccatcattat gttctcgtcc tacaatggat 120
tcagacaaaa tgtttacaga gacgcgatga ttgtcactac tttggacacc ttcaccagtt 180
tgttatccgg ttccacgatc ttcggtatcc tgggtaactt ggcgtacgag ttggacaaaag 240
atgtggatga cgtcactggt tctgcaggaa ctggacttgc cttcatttca taccctgacg 300
cgatctccaa aactttccag ccacagttgt tcgcagtgct gttcttcttg atgatgacgg 360
tactaggtat cggatcagca gttgctttac tttccaccat caacaccgtg atgatggacg 420
cgttccctcg catcaagacc atctacatgt ccgccttctg ctgcactatt ggatttgcca 480
tcggtctcat ttacgtcaca cctggtggcc aatatattct cgagctggtg gattacttcg 540
gtggaacctt cctgattctc ttctgtgcta tcgctgaaat tattggtgta ttctggattt 600
acggcttgga gnnntatgcc tggatattga gtacatggtg ggagttaaac ttcttctact 660
ggnntntgt ttggggcggtt attatgcctg ccatgatgat naccgnnnnn n 711

ES 2 429 938 T3

<210> 22
 <211> 625
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

5 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 540, 541, 542, 543, 614, 615
 <223> n = A,T,C o G

<400> 22

```
gcacgagggt aaacagattt taacactaca ttaatttggt ctagagttaa atgtattaat 60
tccgacttaa aaacagtgct tgtgataagt gaacacaaat tattgagcaa tgactgactt 120
tataaaacaa tatttcaagg aacaatatga aataaatgaa aaaatgcttt cgaaaattga 180
cgcggatctg cgaacctgcg gagcacactt agtagcagtg aagttaatgg tgactgccct 240
cgagttgaaa atgacttcga tgaagacaat gtatcaggat ctaatggaac tcagagaaat 300
aatcgttctt ttaaatccac acttgaagaa accgagataa taatacaata cagtaagggt 360
aacgaatact atcttttaaat ttccttaaat tatggtcata aaaatgatta agttgtttag 420
ctgaacacag tgggtgactg acaggatagg tttcattaaa ctttgcataa tcgatcagaa 480
aaccgtgctt ttcttttttg tactcgacca tttcaataaa gcgatgaccc cataggattn 540
nnntgggtgg tgtagctcga cttecgcttg acaggctgac cagttgatcc tatagtgcct 600
tcaaacta cgannatttc catat 625
```

10 <210> 23
 <211> 472
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 454, 455, 456, 463, 464, 465
 <223> n = A,T,C o G

<400> 23

```
gcacgaggat tttcttaaaa cggactgca gcaaaaagac ggcattgaag gtggactcgg 60
tctgcctatc tggtagctgg tggtttgcct gttcgggtca tggtttatca tcttcgtgat 120
tgtgtcccga ggtgtaaaga gttccggtaa agctgcatac ttcttggtc tcttccccta 180
cgttgtgatg ctcatcttgc ttataacgac ctctattctg cccggagccg gcaccggcat 240
tcttttcttc ctgactccac agtgggacaa actcatagag cttgatgtgt ggtacgctgc 300
cgtgacccaa gtgttcttct ctctgtctgt gtgcaccggt gccatcatta tgttctcgtc 360
ctacaatgga ttcagacaaa atgtttacag agacgcgatg attgtcacta ctttggacac 420
cttcaccagt ttgttatccg gtttcacgat cttnnntatc ctnnntaact tg 472
```

20 <210> 24
 <211> 675
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

25 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 563, 564, 565, 566, 648, 649, 650, 655, 656, 666, 667, 669, 670, 671, 674, 675
 <223> n = A,T,C o G

<400> 24

gcacgaggcc ggtcttcagg gcttccttat cttccactcc ttcggtggag gtactggatc 60
 tggtttcaact tccctcctga tggagcgact ctccgtggac tacggcaaga agtccaagct 120
 ggagttcgcc atctaccggg cgcctcaggt gtccaccgct gtcgtggagc cctacaacte 180
 catcctcacc acccacacca cccttgagca ctccgactgc gccttcatgg tcgacaacga 240
 ggccatctac gacatctgcc gccgcaacct cgacatcgag cgccccacgt acaccaacct 300
 gaaccgtctc atcgggcaga tcgtgtcctc catcacggcc tccctgcgct tcgacggcgc 360
 cctcaacgtc gatcttaccg agttccagac caacttgggt ccctacccc gtatccactt 420
 ccctctggtc acatacggcc cggtcctctc tgccgagaag gcgtaccacg agcagctgtc 480
 ggtggctgaa atcaccaacg catgcttcga gcccgccaac cagatggtca agtgcgaccc 540
 tcgtcacggc aagtacatgg ctnnnntgca tgttgtaccg tgggtgacgtc gtccccaagg 600
 acgtgaacgc cgccatcgcc accatcaaga ccaagcgtac catccagann cgtcnnttgg 660
 tgtccnnenn ngtnn 675

<210> 25
 <211> 650
 <212> ADN

5 <213> Spodoptera frugiperda

<220>

<221> característica_misclánea

<222> 522, 523, 524, 525, 526, 533, 534, 535, 536, 537, 600, 601, 621, 622, 623, 625, 628, 629, 633, 634, 635, 636, 637, 640, 641, 642, 643, 644, 645

10 <223> n = A,T,C o G

<400> 25

gcacgaggat tcgtttggca agcctcttaa ccggtcgcgc tgaacgacga ctgatattta 60
 attaatttat attctacggt aagttcaaca aaactcaatt caaatgctg gagtgcctct 120
 cagtacacgt tggacaagcc ggagtccaga tcggtaatgc ctgctgggaa ttatattgcc 180
 ttgagcatgg aatccagcct gacggccaga tgcccacaga caagaccgtg ggcggtggtg 240
 atgactcctt caacacctt ttcagcgaga ccggtgccgg caagcacgtc cccagggctg 300
 tgtttgttga cttggaacct acagtagttg atgaggtccg cactggcaca tacagacagt 360
 tgtttcatcc agaacaactt atcactggta aggaagatgc ggccaacaac tacgcccgtg 420
 gtcactacac catcggcaag gaaatcgtag acctagtcct cgaccgcate cgtaagctcg 480
 ccgaccagtg caccggtctc cagggcttcc ttatcttcca cnnnnntcgg tgnnnnnaact 540
 gggatctggt ttcacttccc tctgatgga gogactctcc gtggactacg gcaagaagtn 600
 naagctggag ttcgccatct nnnngcncn tnnnnntcn nnnnnctgtc 650

<210> 26
 <211> 621
 <212> ADN

15 <213> Spodoptera frugiperda

<220>

<221> característica_misclánea

<222> 521, 522, 523, 525, 532, 534, 535, 536, 596, 597, 618, 619, 620, 621

20 <223> n = A,T,C o G

<400> 26

ttcggcacga ggggcaagcc tcttaaccgg tcgcgctgaa cgacgactga tatttaatta 60
 atttatattc tacgttaagt tcaacaaaac tcaattcaa atgctgagt gcctctcagt 120
 acacgttggga caagccggag tccagatcgg taatgcctgc tgggaattat attgccttga 180
 gcatggaatc cagcctgatg gccagatgcc cacagacaag accgtgggag gtggtgatga 240
 ctcttcaac accttcttca gcgagaccgg tgccggcaag cactccccca gggctgtggt 300
 tgttgacttg gaaccacag tagttgatga ggtccgact ggcacataca gacagttggt 360
 tcatccagaa caacttatca ctggtaagga agatgcggcc aacaactacg cccgtggtca 420
 ctacaccatc ggcaaggaaa tcgtagacct agtcctcgac cgcacccgta agctcgccga 480
 ccagtgcacc ggtctccagg gcttccttat cttccactcc nnnngtggga gntnnntgga 540
 tctggtttca cttccctcct gatggagcga ctctccgtgg actacggcaa gaagtannaag 600
 ctggagttcg ccatctann n 621

<210> 27
 <211> 602
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

5 <400> 27

gcacgaggat caaagagtta cgaaccgtca ccatactgaa ggagatacca ttcgtcgtgc 60
 cattctcaac acgcgtcctt atattccaag gacttttagc gagagagaag caccgaccact 120
 ggtacgaaat gacgaacttc aacgaggggc cctcgatcaa catcagtgtt cgaaggacgc 180
 atttatatga agatgcattt gataaactta gtccggataa tgaacctgat ttgaagttga 240
 aacttcgcgt gcaactgatc aaccaggccg gtgctggagga agctgggtgc gacggcgggtg 300
 gactattccg agagtttctt tctgagctct taaaatctgc atttgatccg aacaggggtc 360
 tgttccggct gacaatagac aacatgttgt atccgaacc cgcctacat ctactgtacg 420
 atgacttccc catgcactac tacttcgtcg gcaggatgct gggaaaggcg atgtacgaga 480
 acctgttggt ggagctgccg ctggcggagt tcttcctggg caagctgtgc ggctgcgggg 540
 aggccgacgt gcacgcgctg gcctcgctcg accccgcgct gcaccgcggg ttgttactac 600
 tc 602

<210> 28
 <211> 299
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

10 <400> 28

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 222, 223
 <223> n = A,T,C o G

15 <400> 28

gcacgagggc cggcgcgcgt gttcgtgccg tcccgcggcg ccgcgcgcct actggccgcc 60
 gacctgctgg cgctggccgc ggcgcacgcg cagcccgccg ccttcctgcy cgcgcgcccc 120
 gacgtgctgc agcccttccct caagaggatc aacgacaaga tgctgaagga gacggtggtc 180
 gcgggcgtgg cgtacctgca cgagggcgtg gaccgcggcg annggcgcct ggtgcaacaa 240
 ctgctggagt cgggcgcgct ggcgctctgc gtcgtggccg ccgagctggc ctggggact 299

<210> 29
 <211> 624
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

20 <400> 29

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 562, 563, 564, 620, 621, 622, 624
 <223> n = A,T,C o G

25 <400> 29

gcacgagggc aagataaagg tcgcgtgtgg accttaggtt taagtttatt attaaataat 60
 ttagcctaaa cataagtcac ggccaataac gacaactttg cacaagatgt tactgataat 120
 caactaaatg gaaatgccga aaatgggtgg ggcgatacgc aagaacataa tagtgccgaa 180
 gccctggggc gtgatgatga cagaaaactt tttgtcggag gcctgagctg ggaaaccaca 240
 gacaaggagt tacgtgacca cttcagtgca tatggtgaga ttgagagcat caatgtcaag 300
 actgatccaa aactggcag atcaagagga tttgccttta ttgtgttcaa ggcaccagat 360
 tcaatagaca aagtgatggc tgctggagag cacactatta acaacaaaa agttgatccg 420
 aaaaaagcaa aggctagaca tggaaagatc tttgttgggt gtcttagcag tgaaatatca 480
 gatgatgaga tcaaaaactt cttcagtaat tttggaacaa taattgaagt cgagatgcc 540
 tttgacaaaa ccaagaatca gnnaagggg tttctgctta taacattcga gtctgaacag 600
 gtggtcaatg agctgctgan nncn 624

<210> 30
 <211> 644

<212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

<220>
 <221> característica_misclánea

5 <222> 607, 621, 622, 623, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640

<223> n = A,T,C o G

<400> 30

```

gcacgaggcg cgtgtggacc ttaggtttaa gtttattatt aaataattta gcctaaacat 60
aagtcatggc caataacgac aactttgcac aagatgttac tgataatcaa ctaaattggaa 120
atgccgaaaa tgggtggtggc gatcgcgaag aacataatag tgccgaagcc cctgggcgtg 180
atgatgacag aaaacttttt gtcggaggcc tgagctggga aaccacagac aaggagttac 240
gtgaccactt cagtgcataat ggtgagattg agagcatcaa tgtcaagact gatccaaaca 300
ctggcagatc aagaggattt gcctttattg tgttcaaggc accagattca atagacaaag 360
tgatggctgc tggagagcac actattaaca acaaaaaagt tgatccgaaa aaagcaaagg 420
ctagacatgg aaagatcttt gttggtggtc ttagcagtga aatatcagat gatgagatca 480
aaaacttctt cagtaatttt ggaacaataa ttgaagtcga gatgcccttt gacaaaacta 540
agaatcagag gaagggattc tgctttataa cattcgagtc tgaacaggtg gtcaatgagc 600
tgctgangac tcctaagcag nnnattggtg gcannnnnnn cgac 644
    
```

<210> 31
 10 <211> 580
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

<220>
 <221> característica_misclánea

15 <222> 569, 570, 571

<223> n = A,T,C o G

<400> 31

```

gcacgaggat gaagttggct ctgacactct tggctctggc ggcggtggcc accgctaaaa 60
acatcaacgt cgaggatgcc atcgacctag aggacatcac cgcctacgga tacttggcta 120
agatcggtaa acctcttgcc gacgaaatcc gcaaagctga ggaggcagag agcgcattcca 180
gaattgttgg tggtcaggcc tccagcctcg gacagttccc ctaccaggct ggtcttctcg 240
ctgacttctc cgctggccaa ggtgtgtgtg gtggttctt ggtgcgtgcc aaccgtgttc 300
ttactgctgc tcaactgctg ttcgatggcc agaaccaggc ctggagattc accgttgttc 360
ttggctccat ccgtttggtc tccggtggta ccagagttca aacctccaac gttgttatgc 420
atggaagctg gaaccccagt aacatccgta atgacgtcgc catgatcagg ctgaactcca 480
acgttggctt ttcaaacacc attgcactca tcgctctgcc cagcggtagc cagctcaacg 540
aaaacttcgc cggtgaaaac gccgtcgcn nctggattcg 580
    
```

<210> 32
 20 <211> 676
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

<220>
 <221> característica_misclánea

25 <222> 648, 649, 650, 651, 652, 653, 660, 661, 671, 672, 673, 674, 675, 676

<223> n = A,T,C o G

<400> 32

```
gcacgaggat caaaatgaaa ctgttcctcg cagtcgtgtg cttggccgtt gccgcatccg 60
cggtaggat tggagttccg tctcaggaaa acccagtcct tggctaccat caaaacttcg 120
gtattgccga agctgccagg atcaagaagg ctgaggaaga aaccagccct agcgcccaga 180
ggatcgtcgg aggatctgtc actgacattt ccaacgtccc ttaccaggct ggtctcgtga 240
tccaagtttt ggtcatcttc caatccgtgt gcggtggttc catcatctcc cacaaccgca 300
tcgtgaccgc tgctcactgc aactgggacg gttctatcac cgctaactct ttcaccgtcg 360
tacttggttc caacttcctc ttctccggcg gtaaccgcat caccaccaga gatggtgtca 420
tgcaccccaa ctggacccca accaccgctg ccaacgacat tgctgtcctc cgcattagct 480
ccgttacttt caccaacgtg atccagccca tcgctctgcc cagcggaac gagctcaaca 540
acgacttcgt caactggaac gctatcgctt ccggatcggg tcttaccgct gatggtgcta 600
acatcggtag tacccaacgt gtcagctccg tggtagctcc cgtgatcnnn nnnccgcn 660
ncgtagcgt nnnnnn 676
```

<210> 33
 <211> 611
 <212> ADN

5 <213> Spodoptera frugiperda

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 590, 591, 592, 604, 605, 611
 <223> n = A,T,C o G

10 <400> 33

```
gcacgaggaa tcttagttac attggagtga cttttattta tcaataacat ttttatttga 60
agactcagta cgtattatcg cgtagttcaa cagagttgct agttagtatt tctgaaagt 120
gccatcttgc ttttgcaact tttaaatata aaagtcttat tagatcgttt ttactaccga 180
taaatttact aaaaatataa aagtgcaatt tacaattact ctgttagtgt cagtttgtgt 240
gaatttgtcg tagttataaa aggacactgt attgattttg tcaatcagtt tgacgcgatgc 300
gctcattggg tgccgtaaaa aagggttggc caacattccg aacagtgctg ttccggctcg 360
cgttgtcgtg gtgtcggtag agttagtggg ggaattttta cgtgtataac atcaaaaaat 420
ggcgtctggt gtgacagttt cggacgcgtg caaacgcagc tacgaggaga ttaagaaaga 480
caagaagcac cgctacgtgg tgttctacat cagggatgag aaacaaattg acgtagagac 540
cgtcggcgaa cgtaacgcgg aatacgatca gttccttgag gatctgcagn nnggtggcac 600
cggnnagtgc n 611
```

<210> 34
 <211> 674
 <212> ADN

15 <213> Spodoptera frugiperda

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 497, 498, 499, 672, 673, 674
 <223> n = A,T,C o G

20 <400> 34

```
gcacgagggt gatatctaact cttagttaca ttggattgac ttttatttat caataacatt 60
tttatttgaa gactcagtag gtattatcgc gtagttcaac ggagttgcta gtgtagtttt 120
ctgaaagtgt ccatcttgc tttgcaact ttaaataaa aagtcttatt agatcgtttt 180
tactaccgat aaatttatca aaaatataaa agtgcaattt acaattactc tgtagtgctc 240
agtttgtgtg aatttgcctt agttataaaa ggacactgta ttgattttgt caatcagttt 300
gacgcagtcg ctcatgggtt gccgtaaaaa agggttggcc aacattccga acagtgctcg 360
tccggctcgc gttgtcgtgg tgctcggtag gttagtgggt gaatttttac gtgtataaca 420
tcaaaaaatg gcgtctgggt tgacagtttc ggacgcgtgc aaaacgcagc acgaggagat 480
taagaaagac aagaagnnc cgctacgtgg tgttctacat cagggatgag aaacaaattg 540
acgtagagac cgtcggcgaa cgtaacgcgg aatacgatca gttccttgag gatctgcaga 600
agggtggcac cggagagtgc agatattggcc tcttcgactt cgagtacacg caccagtgcc 660
aaggcacgtc gnnn 674
```

<210> 35

<211> 684
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

<220>

5 <221> característica_misclánea
 <222> 648, 649, 650, 652, 653, 654, 657, 659, 660, 661, 662, 667,
 680, 681, 682, 683, 684
 <223> n = A,T,C o G

<400> 35

```
gcacgaggcc tcgtgccgcg cgaatagaca gttttgtgtg cacaatgttg atcctttggc 60
taaatatcat cgcaataatt tgtgtcatac cctacgcaa tggagaagga agggttgcaa 120
tagcgcattt acaatcgcta aagtcagtga ctgggtcaaat tcaatttacg gagacggcaa 180
aagggcttca tgtcgaagga gttatatttg gtttaccacc cgggtgcctac gggtttcacg 240
ttcacgaatt aggagatggt gcacctggtt gcgaccaggc gggccggcac ttcaaccctg 300
agggatccac ccacggtggc aggaactcca ccgtacgcca tgtcgggtgac ctcggaaatg 360
tagtgttcgt tagcgagcga gccgcttatg ctacagtaga ctttgtagat agtctattgg 420
cacttcaagg acgtaatagt atattggggc gctctttggt cttgcatgaa caaacggatg 480
acctaggttt gggaggaaac gcgacgtctt tgactacagg taactcgggg ccccgatag 540
catgtggtgc tattggaatc aaatcacctt atgacccttg gaatgctgct agctctatgt 600
ctccgtcgat gctactattt atcacatctt taactttatt tactttannn tnnnaantnn 660
nngtatnagt atttaatttn nnnn 684
```

10

<210> 36
 <211> 402
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

<220>

15 <221> característica_misclánea
 <222> 321, 322, 323, 324, 325, 354, 355, 366, 398, 399, 400, 402
 <223> n = A, T, C o G

<400> 36

```
gcacgaggct tccacatagc cgaatagaca gttttgtgtg cacaatgttg gtcctttggc 60
taaatatcat cgcaataatt tgtgtcatac cctacgcaa tggagaagga agggttgcaa 120
tagcgcattt acaatcgcta aagtcagtga ctgggtcaaat tcaatttacg gagacggcaa 180
aagggcttca tgtcgaagga gttatatttg gtttaccacc cgggtgcctac gggtttcacg 240
ttcacgaatt aggagatggt gcacctggtt gcgaccaggc gggccggcac ttcaaccctg 300
agggatccaa ccacggtggc nnnnctcca ccgtgcgcca tgtcgggtgac ctcnnaaatg 360
tagtgnttgt tagcgagcga gccgcttatg ctacagtann cn 402
```

20

<210> 37
 <211> 627
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

<220>

25 <221> característica_misclánea
 <222> 393, 394, 395, 396, 397, 435, 436, 437, 439, 619, 620, 621,
 622
 <223> n = A, T, C o G

30 <400> 37

gcacgagggg cgagagatac ggtgcgcaca tagcaacaat atcaaagtac aaagggtcagt 60
aactatgagt ggtaaattgt taaaaactct aatccttggg gcacctgctt caggcaaggg 120
gactatateg tctcggatag tgaagaata tgctgtggca cacgtgtcca gtggggacaa 180
gctgagggac cacattgaga aacaaactga cctaggtaaa gaagtcaaaa agtacttgaa 240
tgaagggaaa cttgtacctg atgatgtcat gataaagttt atgatcacag aattaaanaa 300
agttgaagat aaacatggc tactggatgg attcccggag actgtgggac aggctgatgc 360
tttgtggaag gtacaacctg ttgatgtagt agnnnnntta gtagtgcctt ttgaggtaat 420
catagacaga gtgannanc gctgggtgca cttgccttcg ggccgagtgt ataacattgg 480
cttcaacct cctaaagtgg aaggtaagga tgatgagaca ggtgaggact tggttcagag 540
acctgacgac aagccagagg ctgtgcgcaa gcggctggag atctatgaga gtgtgacgag 600
gccagtcata gaggttctann nngctaa 627

<210> 38
<211> 395
5 <212> ADN
<213> Spodoptera frugiperda

<220>
<221> característica_misclánea
10 <222> 330, 331, 332, 333, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 376, 377, 378, 380,
381, 382, 386, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395 <223> n = A, T, C o G

<400> 38

tgctgctgct ggaagctggg cccaaccctc cggaggagag cattatacca ggottaagac 60
aaaccttgaa agaaacgcc tacgactgga acttcaccac cattgacgac ggggtcacga 120
gccagggcgt ggcgggccac gtgcagagac agccgcgggg caagatgctg ggcggcagcg 180
gctcgctcaa cgacatggtg tacgcgcggg gccaccccga ggactactac gagtgggccg 240
acatcgccgg cgacgtctgg aactggacca acgtgctgga ctacttcaag cggacggagc 300
acatgacgga cgccaatata gttcacaacn nnnagctcat gcagtaccac ggcacggann 360
nnccatnnn nnnntnnngn nncantnnn nnnnn 395

<210> 39
<211> 570
15 <212> ADN
<213> Spodoptera frugiperda

<220>
<221> característica_misclánea
20 <222> 555, 556, 557, 561, 562, 563, 564, 565, 567, 568, 569, 570
<223> n = A,T,C o G

<400> 39

gcacgagggg aaaacatggg aaggaggtcg catcaagatg ttagtgctcg acttgaactg 60
cccgtcggt ggagacgact gcaaagacag ccgcaagaag ttgcttgtgg actacttcca 120
tacaaacctg catacccaga acttctacgc gttccgcttc tttatctgcg aagtgttgaa 180
cttcatcaac gtcgtgggcc agatcttctt catggacttt ttcttgagcg gcgagttctc 240
cacgtacggc agtgacgtgg tcagtttcac cgagatggag cccgaggagc gtgtggacc 300
gatggctaga gtgttcccg aagtgaccaa gtgcacctc cacaaatagc gtccttcagg 360
aaccgtgcag aagtccgacg gtctgtgctg gctgccattg aacatcgtca atgaaaagat 420
ctacgtgttc ctgtggttct ggtttatgat cctgtcgatc ctgagtggaa tttcgctgat 480
ttaccgcatg gccgtggtgg ctggaccgcg cgtgcgcctg tacctgctgc gtgcgcgacg 540
ccgcctggcc ccgcnncgc nnnnnngnnn 570

<210> 40
<211> 648
25 <212> ADN
<213> Spodoptera frugiperda

<220>
<221> característica_misclánea

<222> 639, 640, 641, 643

<223> n = A,T,C o G

<400> 40

```

gcacgaggat ttaaatagct attatgactt tacagactag acggatcaag gccatgcctc 60
tcgcttgcat actcaccatc cgcacatacc gtattgcggt atgtcaataa gttgcaata 120
atgtctgttc agttttacaa ggataagatc agcagtattt gcgaactgta cctactacta 180
agctgataat gtaataatta aactttatta ttgaaataga tatgtataat tgacatcttt 240
ctcaaatggg tgtcaatact gccaaactcta ttaccacaat ttcttttcgt atttgctttt 300
atactgagcc tgatgacgta ctgtactttt tattagaatt taatttttct tatttttctt 360
actacgtagt cattaatct gagaaattaa aaattactaa tttagaactc ccaaattctg 420
aatgagggtc taaaagttg tttaggaatac taaataccat tttaccaaca taaatctaata 480
ttcgttactt aaaatattaa atgtataatg aaatgtctat gataagtgtt tactatcttt 540
ataticgaaa aatttatttt ccatgtttta aaatttattt ttcagatggt ttgacgtgat 600
5 aagtttgtat tttatcaata tctgatagtc gagagttann nantattg 648

```

<210> 41

<211> 716

<212> ADN

<213> Spodoptera frugiperda

10 <220>

<221> característica_misclánea

<222> 612, 613, 614, 703, 704, 705, 706

<223> n = A,T,C o G

<400> 41

```

gcacgaggga ggagaggtgg tggctggctt ccttgcaaac gaagcgtcgt aaattacatc 60
ttatttgtaa attttaataa aaatttgatc gttaaacgat cgaatcagta gtgatttaag 120
tgctcaagca gtttcacatc caatcgaaa tgagttcgag tgtatgctac aagtgttaacc 180
ggacagggca ctctcgcccgc gagtgcaccc aggggtgggtg tgcgcgtcgt gactctgggt 240
tcaaccgtca gcgcgaaaag tgcttcaagt gcaaccgcgc tgggactctc gctcgggatt 300
gcaaggagga ggccgaccgt tgctacagat gtaacggcac gggacacata gcgcgtgagt 360
gcgcgcaaag tccggacgag ccgtcgtggt acaactgcaa caagaccggg cacatcgcac 420
ggaactgcc agagggcggg cgcgacagct ccaaccagac ctgctacaac tgcaacaagt 480
ccggccacat ctcccgcatc tgcccgcagc gcaccaagac ttgttacgtg tgcggaaagc 540
ccggacacat ctcccgcgat tgcgatgagg agcggaaacta acacacgcct ctctcgcatc 600
gcctatatat annntaaact atgtatatta tgatgccacg cacggacgat aagcaaagga 660
15 cgcgatcgc gacactagat cgtaagacca cagactgta tgnnnntaat gcaacg 716

```

<210> 42

<211> 473

<212> ADN

<213> Spodoptera frugiperda

20 <220>

<221> característica_misclánea

<222> 472

<223> n = A,T,C o G

<400> 42

```

gcacgaggat aataaacggt aatatttaac aagttgaaaa gtttgtcttt caatttgtga 60
ttttgtaaag atcattctat ggaatggaca gtttgctatc tgtgaaacat ccattagctt 120
tgtgttgaga gcagaggtcg cggcgccggg gtgatgcggc catggcttcg cggcgcgtga 180
cgcgcaagtg ggaggtgttc gcgggaocgga accgattctg gtgcgacggc cgcctcatga 240
cggcgccgca ccccgccgtg ttctgtctca cgctcgcgct catctgcggc acgtgcgccc 300
tgacttctgc ctctgactgc cccttctctg ccgtgcgctg gtgcgcccgc gtgcccgcgg 360
ccggcgccgc gctgtgcgcg ctgacgctgg cggcgctgct gcgcaocggc ctgtccgacc 420
25 ccggcatcat cccgcgccc gcgcggcccg aggcggccgc gctggaggcg gng 473

```

<210> 43
 <211> 535
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

5 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 15, 16, 358, 375, 376, 377, 378, 379, 426, 427, 428, 450, 451, 452, 454, 457, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 524, 525, 531, 532, 533, 534, 535
 <223> n = A,T,C o G

10 <400> 43

```

cgcgcacgtc gtcnncnaag cccgctgcag cgccggccaa gcccgcccc gcggcgggcgc 60
gcgccaccag tgcgaccagc cgcgcgggccc ccgcgggccc gcccgcccc aagtccgcag 120
taggcgcagc gcggcccgcg gcacaaaaga cagatgcggc cgccaaacc gcggcgacc 180
gggttgcggc tccgctgcc gcgctgtcgg cgcccaggcc ccagcctaag ccggcagaca 240
agaagccagt accgaatggt gacgtgaaag actccaagcc agccgcgcgg cccgcgcccc 300
ggccggccgc ggccgcgcgc cccgcgccc gcccactcc ccgcgcccc gccgcacngg 360
tcgcacccac tactnnnnng agtgccecca agccggcgcc gcgtgctccc ctggacaagc 420
agagcnnnga cctcgctaac aaacgcacn nngncanggc agcaccgcct aggactgctc 480
cccctaagac gacaacgacg acaacaggn nnnnnnnnn ngtnncgaag nnnnn 535
    
```

<210> 44
 <211> 586
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 457, 458, 459, 460, 461, 462, 489, 505, 506, 507, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 567, 568, 569, 570, 571, 573, 577, 578, 579, 580, 581, 586
 <223> n = A,T,C o G

20 <400> 44

```

gcacgaggct ataacaagca gcatataaaa atgaaattct tgctgtcttt cgctgccgtc 60
atcgccgtgg ccgccgctgg cctggtgccc gttggaccgg ccggccctgc gcccgctcct 120
gaggcccctg aggtcttcga gcccgctcgt attggaccgg ctgtcattga ctccctcgag 180
cccatcgcca tcggaccgcg tatcatcgac tccttcgagc ccatcgccat cggaccgcct 240
attgttccat ctcccgagcc cgtcgccatc ggaccgcgcca tcattgagag cccagagccc 300
gttgctgtcg gacctgcatg gattgacttc cccctgccc acggtggtgc tgccggttgc 360
cccgttgagc cctctcccgt ggctgttatc cccggtccc tgtccactga ggttgcttca 420
ggcactcccc tcgttcagat catcctgaac atcaacnnnn nntctgctga cgttagcccc 480
gttgctgtng gcccgcctgt cgagnnnaca cccgtgcacg ttgtggactc tgcccctgaa 540
cccgctccacg ttgtgnnnnn ngccccnnnn ncnatcnnnn ngtcgn 586
    
```

<210> 45
 <211> 623
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

25 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 563, 564, 565, 566, 567, 568, 622, 623
 <223> n = A,T,C o G

30 <400> 45

gcacgaggct tagagtaagc ataggtgtat ttatgtattg agtcggaaga agcaatggac 60
gatccaaata ggatgatggc gcatagcggc gggcttatgg ggccgcaggg ctacggcctg 120
cctggcggcg agggaactcc aaccgcaggg gaaggtgaag cccgcaagca agatattggg 180
gaaatattgc aacagatcat gaatattaca gatcaaagtc ttgatgaagc gcaagcgaga 240
aaacatactc tcaactgtca cagaatgaag cctgccctat tttcagtgtt gtgtgaaatc 300
aaagagaaaa cagtgtctgtc cctccgcaac acgcaagagg aggagcccc agatccccag 360
ctgatgcgct tggacaacat gctcatagcc gagggggtcg ctggccctga aaaggggtgg 420
ggtgcgggcg ctgcagcttc ggcatcagct gctgctggtg aatgggacaa tgccatcgag 480
cactctgact accgtgcgaa gttggcgcag atccgccaga tctaccacca ggagctggac 540
aagtatgaga atgcttgtaa tgnnnnnnc acccacgtga tgaacttact ccgcgagcag 600
agccgcacca ggcctatcac ann 623

<210> 46
<211> 624
<212> ADN

5 <213> Spodoptera frugiperda

<220>
<221> característica_misclánea
<222> 506, 507, 508, 622, 623, 624
<223> n = A,T,C o G

10 <400> 46

gcacgaggcc aggtttgaga aaaacgctta aactgccaca aaatcccgtt ctcgaagaag 60
cacttttcac ttattaataa gtaacttgtg taaaatgtgg tttaaatgtg tattttacta 120
aacctcaata aatataattha tatcaaaata taattttttg gtagttcggg ttatcgagge 180
tctactgtat acctactttt tgttaaataa ttttagtctt atatattttt tttctatact 240
gtattattta ttocctatagt acatattata atccgaacgc tccgtgagtc cgaacagggg 300
cgacttccta actaatccat atctcttaga gctttcgaat atccatttgc ctttttctta 360
aaaagattaa taactattta tatatatccc aaatatataa aaacaaccac tccaattatt 420
attattcaaa tatgacaac tagatagaat gtcccaagaa atttgcaaaa aagtaatggt 480
caaattatta accgaagaac gaattnnnga gtgtataata ttatacagac atttagaat 540
ttttaatagg ctccaatcgc atgagaggtc gctttaaaat tcggcattgg tgtgtgcggt 600
gcaatttaat ctttaacacc cnnn 624

<210> 47
<211> 678
<212> ADN

15 <213> Spodoptera frugiperda

<220>
<221> característica_misclánea
<222> 627, 631, 632, 634, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675
<223> n = A,T,C o G

20 <400> 47

gcacgagggg acgtgtttac aatttacttt cgtgctcgtg tgattttaat taaaacagtg 60
ctaagtgctc taggacgctg aataactgat atttgtttta aaagttgata taaattaatc 120
acaatgaata gagataaacg agaaccagag tatccaacgg agttggagtc tcaattcgta 180
atgctgtttac ctgaggagcc tgcaaaaagt ttgagagaag tgttgaaatc cggagagaac 240
ctgaaaaaca gactgacgat acaaatagaa aacgacatgc gcacgggcca ggttaaggtt 300
gatcactggt tgatgcacgc caagatcgtg gatctaccaa ccatcataga atctctaaaa 360
acgatcgaca acaagagttt ctacaaaaca gcagatatat gccaaatgat gatttgtaaa 420
gaagaacctg accaaccatc cacagaggaa gagtcaccag ctaaaaataa gaaaaaagat 480
ccatacaaag ttgacaaaaa gttcctatgg ccacacggca tcacaccgcc tacgaagaac 540
gtacggaagc gtcgatttag aaaaaccctt aaaaagaat atgtagaagc accagaaatt 600
gaaaaggaag tgaagaggct gctgagngca nncnatgagg ctgttagtgt taactgggag 660
gtcatcaann nnnngat 678

<210> 48
 <211> 683
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

5 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 562, 563, 564
 <223> n = A,T,C o G
 <400> 48

```

gcacgagggg cgaatggaac atggcggtgc taggcaggat gtgcataagt ttttgatttt 60
tgcattttta acgagttgct tatatcagtt agctttctaa ataatttctg acttatttctg 120
tgtgttataa tatttgttat agtgtaaaag cttatccacc ccaggaattt cctatctgga 180
cttacttagt tctgcaatga aaattattat tcgttggtag tgtaaaaata attgtgacaa 240
atatactact ttgcttcagt gtgccgtgtt ggtcatggct acgctcctcc aagagaatgg 300
tataaaggag ttaagcaaag ttgtgcctaa ccgtgggtata tcctcacata gtgtaacaaa 360
tcatatgggtg cctgatcatg aatattgcga agctgggtca actagcacgt cacagatgaa 420
gtgtaccgat acaagtgagg cgatggcgcc acccgccgcc attgaagaag aggaggatac 480
accagaaata gatataatga taaacaatgt tgtgtgcagt tttagtgtta agtgccacct 540
gaaccttaga cagatagcat tnnntgggtg gaacgttgaa tttcgccgcg agaacggcat 600
ggtaactatg aagttacggc gtccatacac tactgcgtcc atctggtcgt ccggccgctg 660
gacgtgcact ggtgcaacca gcg
    
```

10

<210> 49
 <211> 658
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 621, 643, 644, 645, 646, 654, 655, 656, 657
 <223> n = A,T,C o G
 <400> 49

```

gcacgagggg atattgogaa gctgggtcaa ctagcacgct acagatgaag tgtaccgata 60
caagtgaggc gatggcgcca cccgccgcca ttgaagaaga ggaggataca ccagaaatag 120
atataatgat aaacaatggt gtgtgcagtt ttagtgttaa gtgccacctg aaccttagac 180
agatagcatt aatgggtgtg aacgttgaat ttcgccgcca gaacggcatg gtaactatga 240
agttaccggcg tccatacact actgcgtcca tctggtcgtc cggccgctg acgtgcaactg 300
gtgcaaccag cgaggaccag gcgaaggttg ccgcacgacg gtatgcgctg gcccttcaga 360
agctcggctt ccaagtgcgt ttccgcaatt tccgtgtagt caatgtatta ggcacctgtc 420
ggatgccgtt tgggtataagg atcatatctt tttcgaaaaa atacaaggaa gcagactatg 480
aacctgagct ccatcctgga gtcacatata agttatacaa tcctaaagcc aactcaaga 540
tattctccac tgggtggtgtg actatcacag ctccggagtgt gagtgacgtt cagtcagccg 600
tggaacgcat cttccctttg ntgtacgagt tccgcaagcc tcnnnnaccg gcannnna 658
    
```

20

<210> 50
 <211> 652
 <212> ADN
 <213> Spodoptera frugiperda

25 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> 640, 643, 644, 645, 646
 <223> n = A,T,C o G
 <400> 50

ES 2 429 938 T3

gcacgagggg accaaaagct cttttcattg cagctgaagg gtcactgcaa cttggccaat 60
cagaattagc attgaaacta ttcaaagaac taaaacaaga aggaatggaa atcaggcaac 120
atctctattg gcctttgtta gttcagaagg caaaggaaaa tgatgaggaa ggcctcttgc 180
aaattttaaa agaaatgagc agcaatgact ttactgttac tggagaagcg ttaagagact 240
atggtatccc ttacttgata aaaaaagatt ctccacagaa tgtcttactt aaacttcaaa 300
ttgcaaatgt accaacaatc catgctgcaa gaaatctaata ggttgatctt ttggattctg 360
gagacataaa aggcgcagcg gaaatagctc tgcaatatag accttggggc aactactctc 420
ttggtgcccag gtccctcatc aatgcagtga ataagacaaa agatgtagaa tcgtttgcta 480
aaattcttca tgctataagc agtaaacctt tgtcacaggg tgaagaagat gttgctgcca 540
acaatgagga aggtcaaagt gatgaaaata atgatattca tgaagtccgc cgtattgtga 600
ggtcgtctgc caagagtttg gctaaccag acttaatagn aannnttta ga 652

<210> 51
<211> 23
<212> ADN
5 <213> Spodoptera frugiperda
<400> 51
aacatggtat ccgacttcag gaa 23
<210> 52
<211> 19
10 <212> ARN
<213> Spodoptera frugiperda
<400> 52
caugguaucc gacuucagg 19
<210> 53
15 <211> 19
<212> ARN
<213> Spodoptera frugiperda
<400> 53
ccugaagucg gauaccaug 19
20 <210> 54
<211> 23
<212> ADN
<213> Spodoptera frugiperda
25 <400> 54
aaggtcgtg acgagaacaa gga 23
<210> 55
<211> 19
<212> ARN
<213> Spodoptera frugiperda
30 <400> 55
ggucgcugac gagaacaag 19
<210> 56
<211> 19
<212> ARN
35 <213> Spodoptera frugiperda
<400> 56
cuuguucug ucagcgacc 19
<210> 57
<211> 23
40 <212> ADN
<213> Spodoptera frugiperda
<400> 57
aaggtcctg ggcttgagtt cca 23

ES 2 429 938 T3

	<210> 58	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 58	
	guguccuggg cuugaguuc	19
	<210> 59	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 59	
	gaacucaagc ccaggacac	19
	<210> 60	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 60	
	aagaagaagc tcctccacgt gtt	23
	<210> 61	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 61	
	gaagaagcuc cuccacgug	19
25	<210> 62	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 62	
30	cacguggagg agcuucuuc	19
	<210> 63	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 63	
	aaggtcgtg acgagaacaa gga	23
	<210> 64	
	<211> 19	
	<212> ARN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 64	
	ggucgcugac gagaacaag	19
	<210> 65	
	<211> 19	
45	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 65	
	cuuguucug ucagcgacc	19
	<210> 66	
50	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 66 aatgtcctgg ggctgagttt caa	23
5	<210> 67 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 67 uguccugggg cugaguuuc	19
10	<210> 68 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 68 gaaacucagc cccaggaca	19
15	<210> 69 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 69 aagaataagc tctccacgt gtt	23
	<210> 70 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 70 gaauaagcuc cuccacgug	19
	<210> 71 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 71 cacguggagg agcuuauuc	19
	<210> 72 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 72 aattgtcga ggagacccta ttg	23
	<210> 73 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 73 uuugucgagg agaccuau	19
	<210> 74 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 74 auagggucuc cugacaaa	19
	<210> 75 <211> 23	

ES 2 429 938 T3

	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 75	
	aagttcgcgt tcactctga aga	23
5	<210> 76	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 76	
10	guucgcuuc acucuugaa	19
	<210> 77	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 77	
	uucaagagug aacgcgaac	19
	<210> 78	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 78	
	aactgcccct taacctatc tat	23
	<210> 79	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 79	
	cugcccuua accucaucu	19
	<210> 80	
30	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 80	
	agaugagguu aaggggcag	19
35	<210> 81	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 81	
40	aatcacgctg aaacctgt ata	23
	<210> 82	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 82	
	ucacgcugaa accacugua	19
	<210> 83	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 83	
	uacagugguu ucacgcuga	19

ES 2 429 938 T3

	<210> 84	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 84 aaaatatggc gcgctattg ttt	23
	<210> 85	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 85 aauauggccgc gccuauugu	19
	<210> 86	
	<211> 19	
15	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 86 acaauggccg cgccauuu	19
	<210> 87	
20	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 87 aacgttctcg gtcttcact gct	23
25	<210> 88	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 88 cguucucggu cuuucacug	19
	<210> 89	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 89 cagugaaaga ccgagaacg	19
	<210> 90	
	<211> 23	
	<212> ADN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 90 aagtcacgt tccaagtcta cct	23
	<210> 91	
	<211> 19	
45	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 91 gucaucguuc caagucuac	19
	<210> 92	
50	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 92 guagacuugg aacgaugac	19
5	<210> 93 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 93 aacccttga atgtaaggt cgg	23
10	<210> 94 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 94 cccuugaau guuaagguc	19
15	<210> 95 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 95 gaccuuaaca uucaagggg	19
	<210> 96 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 96 aagtacacca tgtgcaagt atg	23
	<210> 97 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 97 guacaccaug uugcaagua	19
	<210> 98 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 98 uacuugcaac augguguac	19
	<210> 99 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 99 aacgtgtcca tgatggctga ctc	23
	<210> 100 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 100 cguguccaug auggcugac	19
	<210> 101 <211> 19	

ES 2 429 938 T3

	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 101	
	gucagccauc auggacacg	19
5	<210> 102	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 102	
10	aaacctacaa aatggccgaa aac	23
	<210> 103	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 103	
	accuacaaaa uggccgaaa	19
	<210> 104	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 104	
	uuucggccau uuuguaggu	19
	<210> 105	
	<211> 23	
25	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 105	
	aatctacgga cccttcttg gag	23
	<210> 106	
30	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 106	
	ucuacggacc cuucuuugg	19
35	<210> 107	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 107	
40	ccaaagaagg guccguaga	19
	<210> 108	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 108	
	aactctgacg tcatcatcta cgt	23
	<210> 109	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 109	
	cucugacguc aucaucuac	19

ES 2 429 938 T3

	<210> 110	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 110 guagaugaug acguacagag	19
	<210> 111	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 111 aagtgcttgg gtaaccccgag	23
	<210> 112	
	<211> 19	
15	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 112 gugcuugggu aaccccgac	19
	<210> 113	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 113 gucggguua cccaagcac	19
25	<210> 114	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 114 aactggctca tctctacag caa	23
	<210> 115	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 115 cuggcucauc uccuacagc	19
	<210> 116	
	<211> 19	
	<212> ARN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 116 gcuguaggag augagccag	19
	<210> 117	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 117 aaacagtgcg tcgtaatata ttc	23
	<210> 118	
50	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 118 acagugcguc guaaauau	19
5	<210> 119 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 119 auauuuacg acgcacugu	19
10	<210> 120 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 120 aaggcacatg gtccttact gat	23
15	<210> 121 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 121 ggcacauggu ccuucacug	19
	<210> 122 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 122 cagugaagga ccaugugcc	19
	<210> 123 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 123 aacacatga ccctcgtgta caa	23
	<210> 124 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 124 caccaugacc cucguguac	19
	<210> 125 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 125 guacacgagg gucauggug	19
	<210> 126 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 126 aaaaaacaca gaccacgttc aca	23
	<210> 127 <211> 19	

ES 2 429 938 T3

	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 127	
	aaaacacaga ccacguuca	19
5	<210> 128	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 128	
10	ugaacguggu cuguguuuu	19
	<210> 129	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 129	
	aatcgatggt ggtgtattc gct	23
	<210> 130	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 130	
	ucgauggugg uguuuuucg	19
	<210> 131	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 131	
	cgaauaacac caccaucga	19
	<210> 132	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 132	
	aaagaaaatg ctacgcgta cga	23
35	<210> 133	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 133	
40	agaaaaugcu acgcguuac	19
	<210> 134	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 134	
	guaacgcgua gcuuuuuca acccttgac actactggaa ga	42
	<210> 135	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 135	
	cccuuggaca cuacuggaa	19

ES 2 429 938 T3

	<210> 136	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 136 uuccaguagu guccaaggg	19
	<210> 137	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 137 aaggatccta tgtgtaccag gtt	23
	<210> 138	
	<211> 19	
15	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 138 ggauccuaug uguaccagg	19
	<210> 139	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 139 ccugguacac auaggaucc	19
25	<210> 140	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 140 aaactcggca cacaacacaa tgg	23
	<210> 141	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 141 acucggcaca caacacaau	19
	<210> 142	
	<211> 19	
	<212> ARN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 142 auuguguugu gugccgagu	19
	<210> 143	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 143 aatacgaaga tatctgcct tcc	23
	<210> 144	
50	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 144 uacgaagaua ucugccuu	19
5	<210> 145 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 145 aagggcagau aucuucgua	19
10	<210> 146 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 146 aatcaacagc tcttacataa atg	23
15	<210> 147 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 147 ucaacagcuc uuacauaaa	19
	<210> 148 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 148 uuuauguaag agcuguuga	19
	<210> 149 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 149 aaagaagatc agaagattgg ccg	23
	<210> 150 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 150 agaagaucag aagauuggc	19
	<210> 151 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 151 gccaaucuuc ugaucuucu	19
	<210> 152 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 152 aaaagccgtc tgctatcaa caa	23
	<210> 153 <211> 19	

ES 2 429 938 T3

	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 153	
	aagccgucug cuauccaac	19
5	<210> 154	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 154	
10	guuggauagc agacggcuu	19
	<210> 155	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 155	
	aatgctaaat gccatgctg cat	23
	<210> 156	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 156	
	ugcuaaaugc caugcuugc	19
	<210> 157	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 157	
	gcaagcaugg cauuuagca	19
	<210> 158	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 158	
	aagatcagaa gattggccgg aag	23
35	<210> 159	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 159	
40	gaucagaaga uuggccgga	19
	<210> 160	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 160	
	uccggccaau cuucugauc	19
	<210> 161	
	<211> 23	
	<212> ADN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 161	
	aattctcag caaatcgata cca	23

ES 2 429 938 T3

	<210> 162	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 162 uucuucagca aaucgauac	19
	<210> 163	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 163 guaucgauuu gcugaagaa	19
	<210> 164	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 164 aaatgctgtc aagaggattt aaa	23
	<210> 165	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 165 augcugucac gaggauuuu	19
25	<210> 166	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 166 uaaauccucu ugacagcau	19
	<210> 167	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 167 aagctcgaga cttgctcttg atg	23
	<210> 168	
	<211> 19	
	<212> ARN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 168 gcucgagacu ugcucuuga	19
	<210> 169	
	<211> 19	
45	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 169 ucaagagcaa gucucgagc	19
	<210> 170	
50	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 170 aactgttagc tcaaggtctg cta	23
5	<210> 171 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 171 cuguuagcuc aaggucugc	19
10	<210> 172 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda.	
	<400> 172 gcagaccuug agcuaacag	19
15	<210> 173 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 173 aagactttct atcagaattt gcg	23
	<210> 174 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 174 gacuuucuau cagaauuug	19
	<210> 175 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 175 caaaucuga uagaaaguc	19
	<210> 176 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 176 aaactaatc atggacgacg aca	23
	<210> 177 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 177 acuuaucou ggacgacga	19
	<210> 178 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 178 ucgucgucca ugauuaagu	19
	<210> 179 <211> 23	

ES 2 429 938 T3

	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 179	
	aaagaagaag aagaagaagg gag	23
5	<210> 180	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 180	
10	agaagaagaa gaagaaggg	19
	<210> 181	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 181	
	cccuucuucu ucuucuucu	19
	<210> 182	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 182	
	aagatcaaga gaatgtcgag gat	23
	<210> 183	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 183	
	gaucaagaga augucgagg	19
	<210> 184	
30	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 184	
	ccucgacauu cucuugauc	19
35	<210> 185	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 185	
40	aaaatcgtcg gtttagcga cgt	23
	<210> 186	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 186	
	aaucgucggu uuuagcgac	19
	<210> 187	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 187	
	gucgcaaaa ccgacgauu	19

ES 2 429 938 T3

	<210> 188	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 188 aactgtcaat aggcagtatg cgt	23
	<210> 189	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 189 cugucaauag gcaguaugc	19
	<210> 190	
	<211> 19	
	<212> ARN	
15	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 190 gcuaucugcc uauugacag	19
	<210> 191	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 191 aactgtacc aacagaccac tgg	23
	<210> 192	
	<211> 19	
	<212> ARN	
25	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 192 ccuguaccaa cagaccacu	19
	<210> 193	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 193 aguggucugu ugguacagg	19
	<210> 194	
	<211> 23	
	<212> ADN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 194 aaccaaaaat gggcaaggaa aag	23
	<210> 195	
	<211> 19	
	<212> ARN	
45	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 195 ccaataaugg gcaaggaaa	19
	<210> 196	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 196 uuuccuugcc cauuuuugg	19
5	<210> 197 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 197 aacgtggtat caccatcgat att	23
10	<210> 198 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 198 cgugguauca ccaucgaua	19
15	<210> 199 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 199 uaucgauggu gauaccacg	19
	<210> 200 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 200 aacaaaatgg actccactga gcc	23
	<210> 201 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 201 caaaauggac uccacugag	19
	<210> 202 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 202 cucaguggag uccauuuug	19
	<210> 203 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 203 aatccgtgac taaccaaaaa tgg	23
	<210> 204 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 204 uccgugacua accaaaaau	19
	<210> 205 <211> 19	

ES 2 429 938 T3

	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 205	
	auuuuugguu agucacgga	19
5	<210> 206	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 206	
10	aacattgtcg tcattggaca cgt	23
	<210> 207	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 207	
	cauugucguc auuggacac	19
	<210> 208	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213>.Spodoptera frugiperda	
	<400> 208	
	guguccaaug acgacaaug	19
	<210> 209	
	<211> 23	
25	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 209	
	aaactcaat tataacctac tag	23
	<210> 210	
30	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 210	
	acuccaauua uaaccuacu	19
35	<210> 211	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 211	
40	aguagguuau aauuggagu	19
	<210> 212	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 212	
	aagtacaagg atctgatcgg caa	23
	<210> 213	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 213	
	guacaaggau cugaucggc	19

ES 2 429 938 T3

	<210> 214	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 214 gccgaucaga uccuuguac	19
	<210> 215	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 215 aagactttct tcatgtggcc cat	23
	<210> 216	
	<211> 19	
15	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 216 gacuuucuuc auguggccc	19
	<210> 217	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 217 gggccacaug aagaaaguc	19
25	<210> 218	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 218 aactcataga gctgatgtg tgg	23
	<210> 219	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 219 cucauagagc uugaugugu	19
	<210> 220	
	<211> 19	
	<212> ARN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 220 acacaucaag cucuaugag	19
	<210> 221	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 221 aagatgtgga tgacgtcact ggt	23
	<210> 222	
50	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 222 gauguggaug acgucacug	19
5	<210> 223 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 223 cagugacguc auccacauc	19
10	<210> 224 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 224 aaccttcctg attctctct gtg	23
15	<210> 225 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 225 ccuuccugau ucucuucug	19
	<210> 226 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 226 cagaagagaa ucaggaagg	19
	<210> 227 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 227 aacagtgcct gtgataagt aac	23
	<210> 228 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 228 cagugcuugu gauaaguga	19
	<210> 229 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 229 ucacuuauca caagcacug	19
	<210> 230 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 230 aagttaatgg tgactgcct cga	23
	<210> 231 <211> 19	

ES 2 429 938 T3

	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 231	
	guuaauggug acugcccuc	19
5	<210> 232	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 232	
10	gagggcaguc accauaac	19
	<210> 233	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 233	
	aataaagcga tgacccata gga	23
	<210> 234	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 234	
	uaaagcgaug accccauag	19
	<210> 235	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 235	
	cuaugggguc aucgcuua	19
	<210> 236	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 236	
	aaacgtact gcagcaaaaa gac	23
35	<210> 237	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 237	
40	acgguacugc agcaaaaag	19
	<210> 238	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 238	
	cuuuuugcug caguaccgu	19
	<210> 239	
	<211> 23	
	<212> ADN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 239	
	aagctgcata cttctggct ctc	23

ES 2 429 938 T3

	<210> 240	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 240 gcugcauacu ucuuggcuc	19
	<210> 241	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 241 gagccaagaa guaugcagc	19
	<210> 242	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 242 aaatgtttac agagacgcga tga	23
	<210> 243	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 243 auguuuacag agacgcgau	19
25	<210> 244	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 244 aucgcgucuc uguaaacau	19
	<210> 245	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 245 aacgtcgatc ttaccgagtt cca	23
	<210> 246	
	<211> 19	
	<212> ARN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 246 cgucgaucuu accgaguuc	19
	<210> 247	
	<211> 19	
45	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 247 gaacucggua agaucgacg	19
	<210> 248	
50	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 248 aattcaaaat gcgtgagtgc atc	23
5	<210> 249 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 249 uucaaaaugc gugagugca	19
10	<210> 250 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 250 ugcacucacg cauuuugaa	19
15	<210> 251 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 251 aaatcgtaga cctagtcctc gac	23
	<210> 252 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 252 aucguagacc uaguccucg	19
30	<210> 253 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 253 cgaggacuag gucuacgau	19
35	<210> 254 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 254 aaactcaatt caaatgcgt gag	23
40	<210> 255 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 255 acucauuuca aaaugcgug	19
45	<210> 256 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
50	<400> 256 cacgcauuuu gaauugagu	19
	<210> 257 <211> 23	

ES 2 429 938 T3

	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 257	
	aacttatcac tggaaggaa gat	23
5	<210> 258	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 258	
10	cuaucacug guaaggaag	19
	<210> 259	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 259	
	cuuccuuacc agugauaag	19
	<210> 260	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 260	
	aagagttacg aaccgtcacc ata	23
	<210> 261	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 261	
	gaguuacgaa ccgucacca	19
	<210> 262	
30	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 262	
	uggugacggu ucguaacuc	19
35	<210> 263	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 263	
40	aaacttagtc cggataatga acc	23
	<210> 264	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 264	
	acuuaguccg gauaauaagaa	19
	<210> 265	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 265	
	uucuuauacc ggacuaagu	19

ES 2 429 938 T3

	<210> 266	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 266 aaggc gatgt acgagaacct gtt	23
	<210> 267	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 267 ggcgauguac gagaaccug	19
	<210> 268	
	<211> 19	
15	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 268 cagguucucg uacaucgcc	19
	<210> 269	
20	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 269 aacgacaaga tgctgaagga gac	23
25	<210> 270	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 270 cgacaagaug cugaaggag	19
	<210> 271	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 271 cuccuucagc aucuugucg	19
	<210> 272	
	<211> 23	
	<212> ADN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 272 aagataaagg tcgcgtgtgg acc	23
	<210> 273	
	<211> 19	
45	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 273 gauaaagguc gcgugugga	19
	<210> 274	
50	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 274 uccacacgcg accuuuauc	19
5	<210> 275 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 275 aatgtcaaga ctgatccaaa cac	23
10	<210> 276 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 276 ugucaagacu gauccaaac	19
15	<210> 277 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 277 guuuggauca gucuugaca	19
	<210> 278 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 278 aacattcgag tctgaacagg tgg	23
	<210> 279 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 279 cauucgaguc ugaacaggu	19
	<210> 280 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 280 accuguucag acucgaug	19
	<210> 281 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 281 aacataagtc atggccaata acg	23
	<210> 282 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 282 cauaaguc au ggccaauaa	19
	<210> 283 <211> 19	

ES 2 429 938 T3

	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 283	
	uuauuggcca ugacuuauug	19
5	<210> 284	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 284	
10	aagaacataa tagtgccgaa gcc	23
	<210> 285	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 285	
	gaacauaaua gugccgaag	19
	<210> 286	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 286	
	cuucggcacu auuauguuc	19
	<210> 287	
	<211> 23	
25	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 287	
	aaacactggc agatcaagag gat	23
	<210> 288	
30	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 288	
	acacuggcag aucaagagg	19
35	<210> 289	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 289	
40	ccucuugauc ugccagugu	19
	<210> 290	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 290	
	aagatcttg ttggtgtct tag	23
	<210> 291	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 291	
	gaucuuguu gguggucuu	19

ES 2 429 938 T3

	<210> 292	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 292 aagaccacca acaaagauc	19
	<210> 293	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 293 aacagtggt caatgagctg ctg	23
	<210> 294	
	<211> 19	
15	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 294 caggugguca augagcugc	19
	<210> 295	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 295 gcagcucuu gaccaccug	19
25	<210> 296	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 296 aagttgctc tgacactctt ggc	23
	<210> 297	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 297 guuggcucug acacucuug	19
	<210> 298	
	<211> 19	
	<212> ARN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 298 caagaguguc agagccaac	19
	<210> 299	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 299 aaatccgcaa agctgaggag gca	23
	<210> 300	
50	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 300 auccgcaaag cugaggagg	19
5	<210> 301 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 301 ccuccucagc uuugcggau	19
10	<210> 302 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 302 aacctgttc ttactgctgc tca	23
15	<210> 303 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 303 ccguguucuu acugcugcu	19
	<210> 304 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 304 agcagcagua agaacacgg	19
	<210> 305 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 305 aacgttgta tgcattgaag ctg	23
	<210> 306 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 306 cguuguuauug cauggaagc	19
	<210> 307 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 307 gcuuccaugc auaacaacg	19
	<210> 308 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 308 aaaacttcgc cggtgaaaac gcc	23
50	<210> 309 <211> 19	

ES 2 429 938 T3

	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 309	
	aacuucgccg gugaaaacg	19
5	<210> 310	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 310	
10	cguuuucacc ggccaaguu	19
	<210> 311	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 311	
	aaatgaaact gttcctcgca gtc	23
	<210> 312	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 312	
	augaaacugu uccucgcag	19
	<210> 313	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 313	
	cugcgaggaa caguucau	19
	<210> 314	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 314	
	aagaaggctg aggaagaaac cag	23
35	<210> 315	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 315	
40	gaaggcugag gaagaaacc	19
	<210> 316	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 316	
	gguuuucuucc ucagccuuc	19
	<210> 317	
	<211> 23	
	<212> ADN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 317	
	aactcttca ccgtcgtact tgg	23

ES 2 429 938 T3

	<210> 318	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 318 cucuuucacc gucguacuu	19
	<210> 319	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 319 aaguacgacg gugaaagag	19
	<210> 320	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 320 aacgacattg ctgtcctccg cat	23
	<210> 321	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 321 cgacauugcu guccuccgc	19
25	<210> 322	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 322 gcggaggaca gcaaugucg	19
	<210> 323	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 323 aacatcgta ctaccaacg tgt	23
	<210> 324	
	<211> 19	
	<212> ARN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 324 caucgguacu acccaacgu	19
	<210> 325	
	<211> 19	
45	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 325 acguugggua guaccgaug	19
	<210> 326	
50	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 326 aagactcagt acgtattatc gcg	23
5	<210> 327 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 327 gacucaguac guauuaucg	19
10	<210> 328 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 328 cgauaauuacg uacugaguc	19
15	<210> 329 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 329 aagttgccat ctgcttttg caa	23
	<210> 330 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 330 guugccaucu ugcuuuugc	19
	<210> 331 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 331 gcaaaagcaa gauggcaac	19
	<210> 332 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 332 aatcagtttg acgcatgcg tca	23
	<210> 333 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 333 ucaguuugac gcaugcgcu	19
	<210> 334 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 334 agcgcaugcg ucaaacuga	19
	<210> 335 <211> 23	

ES 2 429 938 T3

	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 335	
	aatggcgtct ggtgtgacag ttt	23
5	<210> 336	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 336	
10	uggcgucugg ugugacagu	19
	<210> 337	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 337	
	acugucacac cagacgcca	19
	<210> 338	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 338	
	aacgcggaat acgatcagtt cct	23
	<210> 339	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 339	
	cgcggaauac gaucaguuc	19
	<210> 340	
30	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 340	
	gaacugaucg uauuccgcg	19
35	<210> 341	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 341	
40	aagactcagt acgtattatc gcg	23
	<210> 342	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 342	
	gacucaguac guauuacg	19
	<210> 343	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 343	
	cgauauacg uacugaguc	19

ES 2 429 938 T3

	<210> 344	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 344 aagttgcat ctgcttttg caa	23
	<210> 345	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 345 guugccaucu ugcuuuugc	19
	<210> 346	
	<211> 19	
15	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 346 gcaaaagcaa gauggcaac	19
	<210> 347	
20	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 347 aatcagtttg acgcatgcg tca	23
25	<210> 348	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 348 ucaguuugac gcaugcgcu	19
	<210> 349	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 349 agcgcaugcg ucaaacuga	19
	<210> 350	
	<211> 23	
	<212> ADN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 350 aaaaatggcg tctggtgga cag	23
	<210> 351	
	<211> 19	
45	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 351 aaauggcguc uggugugac	19
	<210> 352	
50	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 352 gucacaccag acgccauuu	19
5	<210> 353 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 353 aatacagatca gttccttgag gat	23
10	<210> 354 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 354 uacgaucagu uccuugagg	19
15	<210> 355 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 355 ccucaaggaa cugaucgua	19
	<210> 356 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 356 aataattgt gtcataacct acg	23
	<210> 357 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 357 uaauuugugu cauaccua	19
	<210> 358 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 358 uagguauga cacaaaua	19
	<210> 359 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 359 aagtcagtga ctggtaa tca	23
	<210> 360 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 360 gucagugacu ggucaauu	19
	<210> 361 <211> 19	

ES 2 429 938 T3

	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 361	
	aauuugacca gucacugac	19
5	<210> 362	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 362	
10	aattaggaga tgttgacact ggt	23
	<210> 363	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 363	
	uuaggagaug uugcaccug	19
	<210> 364	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 364	
	caggugcaac aucuccuaa	19
	<210> 365	
	<211> 23	
25	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 365	
	aacaaacgga tgacctaggt ttg	23
	<210> 366	
30	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 366	
	caaacggaug accuagguu	19
35	<210> 367	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 367	
40	aaccuagguc auccguuug	19
	<210> 368	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 368	
	aatgctgcta gctctatgtc tcc	23
	<210> 369	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 369	
	ugcugcuagc ucuagucu	19

ES 2 429 938 T3

	<210> 370	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 370 agacauagag cuagcagca	19
	<210> 371	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 371 aattgtgtc ataccctacg caa	23
	<210> 372	
	<211> 19	
15	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 372 uuugugucau acccuacgc	19
	<210> 373	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 373 gcbuagggua ugacacaaa	19
25	<210> 374	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 374 aaaaggcctt catgtcgaag gag	23
	<210> 375	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 375 aaggcuuca ugucgaagg	19
	<210> 376	
	<211> 19	
	<212> ARN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 376 ccuucgacau gaagccuu	19
	<210> 377	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 377 aattaggaga tgtgcacct ggt	23
	<210> 378	
50	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 378 uuaggagaug uugcaccug	19
5	<210> 379 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 379 caggugcaac aucuccuaa	19
10	<210> 380 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 380 aaaggtcagt aactatgagt ggt	23
15	<210> 381 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 381 aggucaguaa cuaugagug	19
	<210> 382 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 382 cacucauagu uacugaccu	19
	<210> 383 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 383 aagaaatag ctgtggcaca cgt	23
	<210> 384 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 384 gaaauaugcu guggcacac	19
	<210> 385 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 385 gugugccaca gcuaauuuc	19
	<210> 386 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 386 aactgtacc tgatgatgac atg	23
	<210> 387 <211> 19	

ES 2 429 938 T3

	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 387	
	cuuguaccug augauguca	19
5	<210> 388	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 388	
10	ugacaucauc agguacaag	19
	<210> 389	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 389	
	aacattgct tcaactcc taa	23
	<210> 390	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 390	
	cauggcuuc aacacuccu	19
	<210> 391	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 391	
	aggaguguug aagccaug	19
	<210> 392	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 392	
	aagcggctgg agatctatga gag	23
35	<210> 393	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 393	
40	gcggcuggag aucuaugag	19
	<210> 394	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 394	
	cucauagauc uccagccgc	19
	<210> 395	
	<211> 23	
	<212> ADN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 395	
	aacctcccg aggagagcat tat	23

ES 2 429 938 T3

	<210> 396	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 396 cccucccgag gagagcauu	19
	<210> 397	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 397 aaugcucucc ucgggaggg	19
	<210> 398	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 398 aacgccctac gactggaact tca	23
	<210> 399	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 399 cgcccuacga cuggaacuu	19
25	<210> 400	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 400 aaguuccagu cguagggcg	19
	<210> 401	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 401 aactggacca acgtgctgga cta	23
	<210> 402	
	<211> 19	
	<212> ARN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 402 cuggaccaac gugcuggac	19
	<210> 403	
	<211> 19	
45	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 403 guccagcacg ugguccag	19
	<210> 404	
50	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 404 aaaacatggg aaggaggtcg cat	23
5	<210> 405 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 405 aacaugggaa ggaggucgc	19
10	<210> 406 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 406 gcgaccuccu uccauguu	19
15	<210> 407 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 407 aagttgcttg tggactactt cca	23
	<210> 408 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 408 guugcuugug gacuacuuc	19
	<210> 409 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 409 gaaguagucc acaagcaac	19
	<210> 410 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 410 aacgtcgtgg gccagatctt ctt	23
	<210> 411 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 411 cgucgugggc cagaucuuc	19
	<210> 412 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 412 gaagaucugg cccacgacg	19
	<210> 413 <211> 23	

ES 2 429 938 T3

	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 413	
	aatgcgtggc gattcaaac tta	23
5	<210> 414	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 414	
10	aatacgtgcc ttcaggaacc gtg	23
	<210> 415	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 415	
	uacgguccuu caggaaccg	19
	<210> 416	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 416	
	cgguuccuga aggaccgua	19
	<210> 417	
	<211> 23	
25	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 417	
	aatttcgctg atttaccgca tgg	23
	<210> 418	
30	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 418	
	uuucgcugau uuaccgau	19
35	<210> 419	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 419	
40	augcgguaaaa ucagcgaaa	19
	<210> 420	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 420	
	aatttgtag actggtggcc gaa	23
	<210> 421	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 421	
	uuugugagac ugguggccg	19

ES 2 429 938 T3

	<210> 422	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 422 cggccaccag ucucacaaa	19
	<210> 423	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 423 aatctgattg tattcgcccc ctc	23
	<210> 424	
	<211> 19	
	<212> ARN	
15	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 424 ucugauugua uucgcccc	19
	<210> 425	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 425 gggggcgaau acaaucaga	19
	<210> 426	
	<211> 23	
	<212> ADN	
25	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 426 aacactctag ttctgctat tct	23
	<210> 427	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 427 cacucuaguu cugccuauu	19
	<210> 428	
	<211> 19	
	<212> ARN	
40	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 428 aauaggcaga acuagagug	19
	<210> 429	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 429 aacacacatc acaatggcgg ata	23
	<210> 430	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	

ES 2 429 938 T3

	<400> 430 cacacaucaac aauggcgga	19
5	<210> 431 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 431 uccgccauug ugaugugug	19
10	<210> 432 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 432 aaggatggca tcatcggcaa gaa	23
15	<210> 433 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
20	<400> 433 ggauggcauc aucggcaag	19
	<210> 434 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
25	<400> 434 cuugccgaug augccaucc	19
	<210> 435 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
30	<400> 435 aaaggctca tcgacaccgc gaa	23
	<210> 436 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
35	<400> 436 aggcucauc gacaccgcg	19
	<210> 437 <211> 19 <212> ARN <213> Spodoptera frugiperda	
40	<400> 437 cgcgugugcg augaagccu	19
	<210> 438 <211> 23 <212> ADN <213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 438 aaacaaagta tcgcctacac cgc	23
	<210> 439 <211> 19	

ES 2 429 938 T3

	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 439	
	acaaaguauc gccuacacc	19
5	<210> 440	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 440	
10	gguguaggcg auacuuugu	19
	<210> 441	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
15	<400> 441	
	aatagcgtcg atctcaacg act	23
	<210> 442	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 442	
	uagcgucgau cuucaacga	19
	<210> 443	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 443	
	ucguugaaga ucgacgcu	19
	<210> 444	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 444	
	aacgaggccg gatctctaa gca	23
35	<210> 445	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 445	
40	cgaggccgga ucucuuaag	19
	<210> 446	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
45	<400> 446	
	cuuaagagau cggccucg	19
	<210> 447	
	<211> 23	
	<212> ADN	
50	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 447	
	aactcacac ataactagac aaa	23

ES 2 429 938 T3

	<210> 448	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
5	<400> 448	
	cuucacacau aacuagaca	19
	<210> 449	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 449	
	ugucuaguua ugugugaag	19
	<210> 450	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 450	
	aatgcgtggc gattcaaac tta	23
	<210> 451	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 451	
	uuagaaauua uaagcccag	19
25	<210> 452	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Spodoptera frugiperda	
	<400> 452	
30	cugggcuuau aauuucuaa	19

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula vegetal que tiene incorporado establemente en su genoma un polinucleótido heterólogo que comprende un elemento silenciador conectado operablemente a un promotor activo en dicha célula vegetal, en donde dicho elemento silenciador comprende un fragmento de al menos 20 nucleótidos consecutivos del SEQ ID NO: 1,
- en donde dicho elemento silenciador, cuando es ingerido por una plaga del orden Lepidoptera, reduce el nivel de una secuencia diana en dicha plaga a menos de 80% del nivel de la secuencia diana en una plaga de control que no ha ingerido el elemento silenciador y de ese modo controla la plaga del orden Lepidoptera.
- 10 2. Un método para controlar Lepidópteros que comprende alimentar a un Lepidóptero con una composición que comprende un elemento silenciador, en donde dicho elemento silenciador, cuando es ingerido por dicho Lepidóptero, reduce el nivel de una secuencia diana de Lepidóptero a menos de 80% del nivel de la secuencia diana en una plaga de control que no ha ingerido el elemento silenciador y de ese modo controla el Lepidóptero y dicho elemento silenciador comprende un fragmento de al menos 20 nucleótidos consecutivos del SEQ ID NO: 1.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en donde el nivel de la secuencia diana se reduce a menos de 50% del nivel de la secuencia diana en la plaga de control.
4. El método de la reivindicación 2 o 3, en donde dicha composición comprende una planta o parte de planta que tiene incorporado establemente en su genoma un polinucleótido que comprende dicho elemento silenciador.
5. La célula vegetal de la reivindicación 1 o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde dicha plaga comprende *Spodoptera frugiperda*.
- 20 6. La célula vegetal de la reivindicación 1 o 5, en donde dicho elemento silenciador comprende:
- a) un polinucleótido que comprende la secuencia efectora o antisentido de la secuencia mostrada en los SEQ ID NO: 51, 54, o 57;
- b) un polinucleótido que comprende la secuencia efectora o antisentido de una secuencia que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 51, 54, o 57;
- 25 c) un polinucleótido que comprende la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 52, 53, 55, 56, 58, o 59; o
- d) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con los SEQ ID NO: 52, 53, 55, 56, 58, o 59.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde dicho elemento silenciador comprende:
- 30 a) un polinucleótido que comprende la secuencia efectora o antisentido de la secuencia mostrada en los SEQ ID NO: 51, 54, o 57;
- b) un polinucleótido que comprende la secuencia efectora o antisentido de una secuencia que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en los SEQ ID NO: 51, 54, o 57;
- c) un polinucleótido que comprende la secuencia mostrada en los SEQ ID NO: 52, 53, 55, 56, 58, o 59; o
- d) un polinucleótido que comprende la secuencia mostrada en los SEQ ID NO: 52, 53, 55, 56, 58, o 59.
- 35 8. La célula vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 o 6 o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 o 7, en donde dicho elemento silenciador es transcrito a un ARN en horquilla.
9. La célula vegetal de la reivindicación 8, en donde dicho polinucleótido que comprende el elemento silenciador comprende, en el siguiente orden, un primer segmento, un segundo segmento, y un tercer segmento, en donde:
- 40 a) dicho primer segmento comprende al menos aproximadamente 20 nucleótidos que tienen al menos 90% de complementariedad de secuencia con una secuencia diana mostrada en el SEQ ID NO: 1;
- b) dicho segundo segmento comprende un bucle de longitud suficiente para permitir que el elemento silenciador sea transcrito a un ARN en horquilla; y,
- c) dicho tercer segmento comprende al menos aproximadamente 20 nucleótidos que tienen al menos 85% de complementariedad con el primer segmento.
- 45 10. El método de la reivindicación 8, en donde dicho polinucleótido que comprende el elemento silenciador comprende, en el siguiente orden, un primer segmento, un segundo segmento, y un tercer segmento, en donde:
- a) dicho primer segmento comprende al menos aproximadamente 20 nucleótidos que tienen al menos 90% de

complementariedad de secuencia con el polinucleótido diana mostrado en el SEQ ID NO 1;

b) dicho segundo segmento comprende un bucle de longitud suficiente para permitir que el elemento silenciador sea transcrito en forma de un ARN en horquilla; y,

5 c) dicho tercer segmento comprende al menos aproximadamente 20 nucleótidos que tienen al menos 85% de complementariedad con el primer segmento.

10 11. La célula vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 5, 6, 8 o 9, en donde dicha célula vegetal, planta o parte de planta tienen incorporado establemente en su genoma un segundo polinucleótido que comprende un elemento intensificador del supresor que comprende la secuencia de la plaga diana o un fragmento o variante activos de la misma, en donde la expresión combinada del elemento silenciador y el elemento intensificador del supresor incrementa la concentración de un ARNi inhibidor específico para la secuencia diana de la plaga en dicha célula vegetal.

15 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, 7, 8 o 10, en donde dicha célula vegetal, planta o parte de planta tienen incorporado establemente en su genoma un segundo polinucleótido que comprende un elemento intensificador del supresor que comprende la secuencia de la plaga diana o un fragmento o variante activos del mismo, en donde la expresión combinada del elemento silenciador y el elemento intensificador del supresor incrementa la concentración de un ARNi inhibidor específico para la secuencia diana de la plaga en dicha célula vegetal.

13. La célula vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 6, 8, 9 u 11, en donde:

20 a) dicha célula vegetal es de una monocotiledónea o dicha planta es una monocotiledónea, y opcionalmente dicha monocotiledónea es maíz, cebada, mijo, trigo o arroz; o

b) dicha célula vegetal es de una dicotiledónea, o dicha planta es una dicotiledónea, y en donde opcionalmente dicha dicotiledónea es soja, canola, alfalfa, girasol, cártamo, tabaco, *Arabidopsis*, o algodón.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, 7, 8, 10 o 12, en donde:

25 a) dicha célula vegetal es de una monocotiledónea o dicha planta es una monocotiledónea, y opcionalmente dicha monocotiledónea es maíz, cebada, mijo, trigo o arroz; o

b) dicha célula vegetal es de una dicotiledónea, o dicha planta es una dicotiledónea, y en donde opcionalmente dicha dicotiledónea es soja, canola, alfalfa, girasol, cártamo, tabaco, *Arabidopsis*, o algodón.

15. Una planta o parte de planta que comprende una célula vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 6, 8, 9, 11 o 13.

30 16. La planta o parte de planta de la reivindicación 15, en donde la expresión combinada de dicho elemento silenciador y el elemento intensificador del supresor conectado operablemente a un promotor específico del floema incrementa la concentración de un ARN inhibidor específico para la secuencia diana de la plaga en el floema de dicha planta o parte de planta.

17. Una semilla transgénica de la planta de la reivindicación 15 o 16.

35