

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 933**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
A01N 65/00 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2006 E 10186052 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2270182**

54 Título: **ARNbc como agente de control de insectos**

30 Prioridad:

16.09.2005 US 718034 P
12.01.2006 US 758191 P
07.02.2006 US 771160 P
16.08.2006 US 837910 P
15.09.2006 WO PCT/IB2006/003446

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.05.2016

73 Titular/es:

DEVGEN N.V. (100.0%)
Technologiepark 30
9052 Zwijnaarde, BE

72 Inventor/es:

RAEMAEKERS, ROMAAN;
FELDMANN, PASCALE;
PLAETINCK, GEERT;
NOOREN, IRENE;
VAN BLEU, ELS;
PECQUEUR, FRÉDÉRIC;
KUBLER, LAURENT;
DAMME, NICOLE;
DEGRAVE, LIES;
REMORY, ISABEL y
BOGAERT, THIERRY

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 568 933 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

ARNBC como agente de control de insectos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general al control genético de infestaciones por plagas. Más específicamente, la presente invención se refiere a tecnologías recombinantes para suprimir o inhibir la expresión de secuencias codificantes dianas en una plaga.

Introducción

10 Las mordeduras y picaduras de las plagas de insectos y de otras plagas pueden ocasionar lesiones e incluso la muerte. Adicionalmente, muchas plagas transmiten bacterias y otros patógenos que causan enfermedades. Por ejemplo, los mosquitos transmiten patógenos que causan malaria, fiebre amarilla, encefalitis, y otras enfermedades. La peste bubónica, o muerte negra, está causada por bacterias que infectan a ratas y a otros roedores. Las composiciones para controlar infestaciones por plagas microscópicas se han proporcionado en forma de composiciones antibióticas, antivirales y antifúngicas. Los métodos para controlar las infestaciones por plagas, tales como los nematodos y los insectos, han estado típicamente en forma de composiciones químicas que se aplican a las superficies sobre las que residen las plagas, o se han administrado a los animales infestados en forma de gránulos, polvos, comprimidos, pastas, o cápsulas.

15 Los cultivos comerciales son a menudo dianas para el ataque de insectos. Se ha logrado un progreso sustancial en las últimas décadas hacia el desarrollo de métodos y composiciones más eficientes para controlar las infestaciones por insectos en plantas. Los pesticidas químicos han sido muy eficaces para erradicar las infestaciones por plagas. Sin embargo, hay varias desventajas en cuanto al uso de pesticidas químicos. No solo son posiblemente perjudiciales para el medio, sino que los pesticidas químicos no son selectivos y pueden perjudicar a la flora y a la fauna no destinataria. Los pesticidas químicos persisten en el ambiente y generalmente se metabolizan lentamente, o no se metabolizan. Se acumulan en la cadena alimentaria y particularmente en las especies de depredadores superiores. La acumulación de los pesticidas químicos da como resultado el desarrollo de resistencia a los agentes y en especies más arriba en la escala evolutiva, se pueden actuar como agentes mutagénicos y/o carcinogénicos y causar modificaciones genéticas irreversibles y perjudiciales.

20 Debido a los peligros asociados con los pesticidas químicos, se han desarrollado estrategias biológicas para controlar las infestaciones por plagas. Por ejemplo, el control biológico usando la proteína Cry3A de *Bacillus thuringiensis* ha controlado de manera eficaz a larvas del escarabajo de la patata de Colorado, bien como formulaciones pulverizadas sobre el follaje o expresada en las hojas de la patata. Un agente biológico alternativo es el ARN bicatenario (ARNbc). En los últimos años, la regulación negativa de genes (también denominada "silenciamiento génico") en organismos multicelulares mediante interferencia de ARN se ha convertido en una técnica bien establecida.

25 La interferencia de ARN (ARNi) proporciona una herramienta potencialmente potente para controlar la expresión génica debido a su especificidad de selección de la diana y a una eficacia notablemente alta en la supresión del ARNm diana. ARNi se refiere al proceso de silenciamiento génico post-transcripcional específico de secuencia mediado por ARN pequeños interferentes (ARNpi) (Zamore, P. et al., Cell 101:25-33 (2000); Fire, A. et al., Nature 391:806 (1998); Hamilton et al., Science 286, 950-951 (1999); Lin et al., Nature 402:128-129 (1999)). Aunque los mecanismos subyacentes a la ARNi no están completamente caracterizados, se cree que la presencia de ARNbc en las células activa la ARNi activando la enzima Dicer ribonucleasa III (Zamore, P. et al., (2000); Hammond et al., Nature 404, 293 (2000)). Dicer procesa el ARNbc en pequeños trozos llamados ARN pequeños interferentes (ARNpi), que son de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud y comprenden aproximadamente 19 dúplex de pares de bases (Zamore et al., (2000); Elbashir et al., Genes Dev., 15, 188 (2001)). Después de la administración a células, las moléculas de ARNpi se asocian con un complejo de endonucleasa, citado comúnmente como un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que junta la hebra antisentido del ARNpi y la diana génica de ARNm celular. RISC escinde al ARNm, que después se libera y degrada. De manera importante, RISC es después capaz de degradar copias adicionales del ARNm diana.

30 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos y composiciones para controlar la infestación por plagas reprimiendo, retrasando o de otro modo reduciendo la expresión génica en una plaga particular.

50 Sumario de la invención

La invención proporciona un ARN bicatenario, que comprende hebras complementarias hibridadas, en la que al menos una de dichas hebras comprende un polirribonucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 55 (i) polirribonucleótidos complementarios a al menos 21 nucleótidos contiguos de un gen diana representado por cualquiera de las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677,
- (ii) polirribonucleótidos complementarios a al menos 21 nucleótidos contiguos de un gen diana que codifica la

secuencia de aminoácidos representado por cualquiera de las SEC ID N°: 24, 260, 897 y 1114 y (iii) polirribonucleótidos que tienen al menos un 85 % de identidad de secuencia con los polirribonucleótidos de (i) o (ii).

5 En una realización preferida, la ingestión de dicho polirribonucleótido por una plaga de insectos da como resultado la regulación negativa de dicho gen diana.

La presente invención también proporciona un polinucleótido aislado que codifica el ARN bicatenario como se describe anteriormente, y un vector que comprende dicho polinucleótido.

10 En una realización de la invención, se proporciona una célula transformada con y que comprenden un polinucleótido de la invención. En una realización preferida, la célula es una célula bacteriana. En una realización más preferida, la célula bacteriana se destruye con tratamiento térmico. En otra realización preferida, la célula es una célula de levadura. En otra realización aún preferida, la célula es una célula de alga.

La presente invención también proporciona un producto alimentario que comprende una célula como se ha descrito anteriormente.

15 Adicionalmente la invención proporciona la composición que comprende un polinucleótido o un ARN bicatenario de la invención. En una realización preferida, dicha composición se selecciona del grupo que consiste en una pulverización, un polvo, una forma sólida, una forma de pasta, un gránulo, un gel y una cápsula.

Adicionalmente la invención proporciona un pesticida que comprende un polinucleótido, un ARN bicatenario o una célula de la invención.

20 En una realización de la invención, se proporciona un método para controlar la infestación por plagas de insectos, que comprende exponer una plaga de insecto a una composición que comprenda un ARN bicatenario o una célula de acuerdo con la invención.

25 En otra realización, se proporciona un método para proteger a un objeto de la infestación por una plaga, que comprende exponer una plaga de insecto a una composición que comprenda un ARN bicatenario o una célula de la invención. En una realización preferida, dicho objeto se selecciona del grupo que consiste en madera, árboles, cultivos, libros, encuadernaciones, textiles, bolsas de ropa y envases para almacenar alimentos.

Además, la invención proporciona el uso de un polinucleótido aislado, un ARN bicatenario, una célula, una composición, o un pesticida de la invención, para la prevención o el tratamiento de una infestación por insectos.

Breve descripción de los dibujos

30 **Figura 1-LD:** Supervivencia de *L. decemlineata* con dieta artificial tratada con ARNbc. Se alimentó a los insectos en el segundo estado larvario con dieta tratada con 50 µl de solución aplicada tópicamente de ARNbc (dianas o control de gfp). La dieta se sustituyó por una dieta nueva que contenía ARNbc aplicado tópicamente después de 7 días. El número de insectos supervivientes se evaluó en los días 2, 5, 7, 8, 9 y 13. El porcentaje de larvas supervivientes se calculó en relación al día 0 (comienzo del ensayo). LD006 diana: (SEC ID N°: 178); LD007 diana (SEC ID N°: 183); LD010 diana (SEC ID N°: 188); LD011 diana (SEC ID N°: 193); LD014 diana (SEC ID N°: 198); ARNbc de gfp (SEC ID N°: 235).

40 **Figura 2-LD:** Supervivencia de *L. decemlineata* con dieta artificial tratada con ARNbc. Se alimentó a los insectos en el segundo estado larvario con dieta tratada con 50 µl de solución aplicada tópicamente de ARNbc (dianas o control de gfp). La dieta se sustituyó solo por una dieta nueva después de 7 días. El número de insectos supervivientes se evaluó en los días 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12 y 14. El porcentaje de larvas supervivientes se calculó en relación al día 0 (comienzo del ensayo). LD001 diana (SEC ID N°: 163); LD002 diana (SEC ID N°: 168); LD003 diana (SEC ID N°: 173); LD015 diana (SEC ID N°: 215); LD016 diana (SEC ID N°: 220); ARNbc de gfp (SEC ID N°: 235).

45 **Figura 3-LD:** Peso medio de larvas de *L. decemlineata* en discos foliares de patata tratados con ARNbc. Se alimentó a los insectos en el segundo estado larvario con discos foliares tratados tópicamente con 20 µl de una solución aplicada tópicamente (10 ng/µl) de ARNbc (LD002 diana o gfp). Después de dos días se transfirió a los insectos cada día a hojas no tratadas.

Figura 4-LD: Supervivencia de *L. decemlineata* con dieta artificial tratada con versiones más cortas de ARNbc de LD014 diana y ARNbc concatémico. Se alimentó a los insectos en el segundo estado larvario con dieta tratada con 50 µl de solución aplicada tópicamente de ARNbc (gfp o dianas). El número de insectos supervivientes se evaluó en los días 3, 4, 5, 6 y 7. El porcentaje de larvas supervivientes se calculó en relación al día 0 (comienzo del ensayo).

50 **Figura 5-LD:** Supervivencia de larvas de *L. decemlineata* con dieta artificial tratada con diferentes concentraciones de ARNbc de LD002 diana (a), LD007 diana (b), LD010 diana (c), LD011 diana (d), LD014 diana (e), LD015 diana (f), LD016 (g) y LD027 diana (h). Se alimentó a los insectos en el segundo estado larvario con dieta tratada con 50 µl de solución aplicada tópicamente de ARNbc. La dieta se sustituyó por una dieta nueva que contenía ARNbc aplicado tópicamente después de 7 días. El número de insectos supervivientes se evaluó a intervalos regulares. El

porcentaje de larvas supervivientes se calculó en relación al día 0 (comienzo del ensayo).

Figura 6-LD: Efectos de cepas de *E. coli* que expresan ARNbc de LD010 diana en la supervivencia de larvas del escarabajo de la patata de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, a lo largo del tiempo. Las dos cepas bacterianas se ensayaron en bioensayos separados basados en dieta artificial: (a) AB301-105(DE3); los puntos de datos para pGBNJ003 y pGN29 representan los valores de mortalidad general de 5 clones bacterianos diferentes, (b) BL21(DE3); los puntos de datos para pGBNJ003 y pGN29 representan los valores de mortalidad general de 5 clones bacterianos diferentes y uno individual, respectivamente. Las barras de error representan desviaciones estándar.

Figura 7-LD: Efectos diferentes clones de cepas de *E. coli* (a) AB301-105 (DE3) y (b) BL21 (DE3) que expresan ARNbc de LD010 diana en la supervivencia de larvas del escarabajo de la patata de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, 12 días después de la infestación. Los puntos de datos son valores de mortalidad media para cada clon para pGN29 y pGBNJ003. El clon 1 de AB301-105 (DE3) que porta el plásmido pGBNJ003 mostró una mortalidad del 100 % para el EPC en ese punto temporal. Las barras de error representan desviaciones estándar.

Figura 8-LD: Efectos diferentes clones de cepas de *E. coli* (a) AB301-105 (DE3) y (b) BL21 (DE3) que expresan ARNbc de LD010 diana en el crecimiento y desarrollo de los supervivientes larvarios del escarabajo de la patata de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, 7 días después de la infestación. Los puntos de datos son valores de % de peso larvario medio para cada clon (un clon para pGN29 y cinco clones para pGBNJ003) basándose en los datos de la Tabla 10. El tratamiento solo con dieta representa un peso larvario 100 % normal.

Figura 9-LD: Supervivencia de larvas del escarabajo de la patata de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, en plantas de patata rociadas con bacterias productoras de ARN bicatenario 7 días después de la infestación. Se contó el número de supervivientes larvarios y se expresó en términos de % de mortalidad. La cepa bacteriana hospedadora usada fue la cepa deficiente en RNasalll AB301-105 (DE3). La diana génica de insecto fue LD010.

Figura 10-LD: Retraso de crecimiento/desarrollo de supervivientes larvarios del escarabajo de la patata de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, alimentados con plantas de patata rociadas con bacterias productoras de ARNbc 11 días después de la infestación. La cepa bacteriana hospedadora usada fue la cepa deficiente en RNasalll AB301-105 (DE3). Las cifras de los datos se representan como porcentaje del peso larvario normal; 100 % del peso larvario normal dado para tratamiento solo con dieta. La diana génica de insecto fue LD010. Las barras de error representan desviaciones estándar.

Figura 11-LD: Resistencia de la patata al daño causado por larvas del escarabajo de la patata de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, por bacterias productoras de ARN bicatenario 7 días después de la infestación. A la izquierda, planta rociada con 7 unidades de bacteria AB301-105 (DE3) que contiene al plásmido pGN29; a la derecha, planta rociada con 7 unidades de bacteria AB301-105 (DE3) que contiene al plásmido pGBNJ003. Una unidad se define como el equivalente a 1 ml de una suspensión bacteriana a un valor de DO de 1 a 600 nm. La diana génica de insecto fue LD010.

Figura 12-LD: Supervivencia de adultos de *L. decemlineata* en discos foliares de patata tratados con ARNbc. Se alimentó a insectos adultos jóvenes con discos foliares tratados con ARN bicatenario durante los dos primeros días y después en follaje de patata no tratado. El número de insectos supervivientes se evaluó de manera regular; se registró a los insectos que se movían como insectos que estaban vivos y parecían moverse normalmente; los insectos moribundos como insectos que estaban vivos pero que parecía que estaban enfermos y que se movían lentamente, estos insectos no eran capaces de volver a colocarse tras ponerlos hacia arriba. LD002 diana (SEC ID N°: 168); LD010 diana (SEC ID N°: 188); LD014 diana (SEC ID N°: 198); LD016 diana (SEC ID N°: 220); ARNbc de gfp (SEC ID N°: 235).

Figura 13-LD: Efectos de ARN bicatenario diana producido por bacterias contra larvas de *L. decemlineata*. Se aplicaron cincuenta µl de una suspensión de DO 1 de bacterias tratadas con calor que expresaban ARNbc (SEC ID N°: 188) tópicamente sobre la dieta artificial en cada pocillo de una placa de 48 pocillos. Se pusieron larvas de EPC en estado L2 en cada pocillo. En el día 7, se tomó una foto de las larvas de EPC en una placa que contenía (a) dieta con bacterias que expresan ARN bicatenario 10 diana, (b) dieta con bacterias que portan el vector vacío pGN29 y, (c) solo dieta.

Figura 14-LD Efectos en la supervivencia larvaria de EPC y el crecimiento de diferentes cantidades de *E. coli* de la cepa AB301-105(DE3) inactivadas que portan el plásmido pGBNJ003 aplicadas tópicamente al follaje de la patata antes de la infestación por insectos. Se alimentó a diez larvas de L1 con patata tratada durante 7 días. Cantidad de suspensión bacteriana rociada sobre las plantas: 0,25 U, 0,08 U, 0,025 U, 0,008 U de diana 10 y 0,25 U de pGN29 (control negativo; también incluye agua Milli-Q). Una unidad (U) se define como la cantidad bacteriana equivalente presente en 1 ml de cultivo con un valor de densidad óptica de 1 a 600nm. Se roció un volumen total de 1,6 ml sobre cada planta. La diana génica de insecto fue LD010.

Figura 15-LD Resistencia de la patata al daño causado por larvas de EPC por *E. coli* de cepa AB301-105(DE3) inactivadas que portan el plásmido pGBNJ003 siete días después de la infestación. (a) agua, (b) 0,25 U de *E. coli* AB301-105(DE3) que portan pGN29, (c) 0,025 U de *E. coli* AB301-105(DE3) que portan pGBNJ003, (d) 0,008 U de *E. coli* AB301-105(DE3) que portan pGBNJ003. Una unidad (U) se define como la cantidad bacteriana equivalente

presente en 1 ml de cultivo con un valor de densidad óptica de 1 a 600nm. Se roció un volumen total de 1,6 ml sobre cada planta. La diana génica de insecto fue LD010.

Figura 1-PC: Efectos de los ARNbc diana ingeridos en la supervivencia y crecimiento de larvas de *P. cochleariae*. Se alimentó a las larvas neonatas con discos foliares de colza tratados con 25 µl de solución de ARNbc a 0,1 µg/µl aplicada tópicamente (dianas o control de gfp). Después de 2 días, los insectos se transfirieron a nuevos discos foliares tratados con ARNbc. En el día 4, las larvas de un replicado por cada tratamiento se recogieron y se pusieron en una placa de Petri que contenían nuevo follaje de colza no tratado. Los insectos se evaluaron en los días 2, 4, 7, 9 y 11. **(a)** Supervivencia de larvas de *P. cochleariae* en discos foliares de colza tratados con ARNbc. El porcentaje de larvas supervivientes se calculó en relación al día 0 (comienzo del ensayo). **(b)** Pesos medios de larvas de *P. cochleariae* en discos foliares de colza tratados con ARNbc. Se pesó juntos a los insectos de cada replicado y se determinó el peso medio por larva. Las barras de error representan desviaciones estándar. Diana 1: SEC ID N°: 473; diana 3: SEC ID N°: 478; diana 5: SEC ID N°: 483; diana 10: SEC ID N°: 488; diana 14: SEC ID N°: 493; diana 16: SEC ID N°: 498; diana 27: SEC ID N°: 503; ARNbc de gfp: SEC ID N°: 235.

Figura 2-PC: Supervivencia de *P. cochleariae* en discos foliares de colza tratados con diferentes concentraciones de ARNbc de **(a)** PC010 diana y **(b)** PC027 diana. Se colocaron larvas neonatas en discos foliares tratados con 25 µl de solución de ARNbc aplicada tópicamente. Los insectos se transfirieron a nuevos discos foliares tratados en el día 2. En el día 4 para PC010 diana y en el día 5 para PC027 diana, se transfirió a los insectos a hojas no tratadas. El número de insectos supervivientes se evaluó en los días 2, 4, 7, 8, 9 y 11 para PC010 y 2, 5, 8, 9 y 12 para PC027. El porcentaje de larvas supervivientes se calculó en relación al día 0 (comienzo del ensayo).

Figura 3-PC: Efectos de *E.coli* de la cepa AB301-105(DE3) que expresan PC010 diana de ARNbc en la supervivencia del escarabajo de la hoja de la mostaza, *P. cochleariae*, a lo largo del tiempo. Los puntos de datos para cada tratamiento representan los valores de mortalidad media de 3 replicados diferentes. Las barras de error representan desviaciones estándar. Diana 10: SEC ID N°: 488

Figura 1-EV: Supervivencia de larvas de *E. varivestis* en discos foliares de alubia tratados con ARNbc. Se alimentó a las larvas neonatas con discos foliares de alubia tratados con 25 µl de solución de ARNbc a 1 µg/µl aplicada tópicamente (dianas o control de gfp). Después de 2 días, los insectos se transfirieron a nuevos discos foliares tratados con ARNbc. En el día 4, las larvas de un tratamiento se recogieron y se pusieron en una caja de plástico que contenían nuevo follaje de alubia no tratado. Se evaluó la mortalidad de los insectos en los días 2, 4, 6, 8 y 10. El porcentaje de larvas supervivientes se calculó en relación al día 0 (comienzo del ensayo). Diana 5: SEC ID N°: 576; diana 10: SEC ID N°: 586; diana 15: SEC ID N°: 591; diana 16: SEC ID N°: 596; ARNbc de gfp: SEC ID N°: 235.

Figura 2-EV: Efectos de ARNbc diana ingerido en la supervivencia de adultos de *E. varivestis* y resistencia al daño foliar por insectos de judía verde. **(a)** Supervivencia de adultos de *E. varivestis* en hojas de alubia tratadas con ARNbc. Se alimentó a los adultos con discos foliares de alubia tratados con 75 µl de solución de ARNbc a 0,1 µg/µl aplicada tópicamente (dianas o control de gfp). Después de 24 horas, los insectos se transfirieron a nuevos discos foliares tratados con ARNbc. Después de 24 horas adicionales, los adultos de un tratamiento se recogieron y se pusieron en una caja de plástico que contenía nuevas plantas de alubia enteras en maceta no tratadas. Se evaluó la mortalidad de los insectos en los días 4, 5, 6, 7, 8 y 11. El porcentaje de adultos supervivientes se calculó en relación al día 0 (comienzo del ensayo). Diana 10: SEC ID N°: 586; diana 15: SEC ID N°: 591; diana 16: SEC ID N°: 596; ARNbc de gfp: SEC ID N°: 235. **(b)** Resistencia al daño foliar de la alubia causado por adultos de *E. varivestis* por ARNbc. Las plantas enteras que contenían insectos de un tratamiento (véase (a)) se comprobaron visualmente en busca de daño foliar en el día 9. **(i)** diana 10; **(ii)** diana 15; **(iii)** diana 16; **(iv)** ARNbc de gfp; **(v)** no tratados.

Figura 1-TC: Supervivencia de larvas de *T. castaneum* con dieta artificial tratadas con ARNbc de diana 14. Se alimentó a las larvas neonatas con dieta basada en una mezcla de harina/leche con 1 mg ARNbc de diana 14. El control fue agua (sin ARNbc) en la dieta. Se efectuaron cuatro replicados de 10 larvas en primer estadio por replicado para cada tratamiento. Se evaluó la supervivencia de los insectos como media del porcentaje en los días 6, 17, 31, 45 y 60. El porcentaje de larvas supervivientes se calculó en relación al día 0 (comienzo del ensayo). Las barras de error representan desviaciones estándar. TC014 diana: SEC ID N°: 878.

Figura 1-MP: Efecto de ARNbc de diana 27 en la supervivencia de ninfas de *Myzus persicae*. Aquellas en el primer estadio se pusieron en cámaras de alimentación que contenían 50 µl de dieta líquida con 2 µg/µl de ARNbc (diana 27 o control de ARNbc de gfp). Por tratamiento, se pusieron 5 cámaras de alimentación con 10 estadios en cada cámara de alimentación. El número de supervivientes se evaluó a los 8 días después de comenzar el bioensayo. Las barras de error representan desviaciones estándar. MP027 diana: SEC ID N°: 1061; ARNbc de gfp: SEC ID N°: 235.

Figura 1-NL: Supervivencia de *Nilaparvata lugens* en dieta artificial líquida tratada con ARNbc. Se alimentó a ninfas del primer o segundo estadio larvario con dieta suplementada con solución de 2 mg/ml de dianas de ARNbc en bioensayos separados: (a) NL002, NL003, NL005, NL010; b) NL009, NL016; c) NL014, NL018; d) NL013, NL015, NL021. La supervivencia de insectos sobre dianas se comparó con la de solo dieta y dieta con control de ARNbc de gfp a la misma concentración. La dieta se reemplazó por una dieta nueva que contenía ARNbc cada dos días. El número de insectos supervivientes se evaluó cada día.

Figura 2-NL: Supervivencia de *Nilaparvata lugens* en dieta artificial líquida tratada con diferentes concentraciones de ARNbc de NL002 diana. Se alimentó a ninfas del primer o segundo estadio larvario con dieta suplementada con 1, 0,2, 0,08 y 0,04 mg/ml (concentración final) de NL002. La dieta se reemplazó por una dieta nueva que contenía ARNbc cada dos días. El número de insectos supervivientes se evaluó cada día.

5 Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona un medio para controlar las infestaciones por plagas exponiendo a una plaga a una secuencia codificante diana que reprime o inhibe de manera post-transcripcional una función biológica requerida en la plaga. Después de la exposición a una secuencia diana, la diana forma un ARNbc correspondiente en parte o en la totalidad de un gen esencial de la plaga y causa la regulación negativa de la diana de la plaga mediante interferencia de ARN (ARNi). Como resultado de la regulación negativa del ARNm, el ARNbc impide la expresión de la proteína diana de la plaga y por tanto causa la muerte, detiene el crecimiento, o produce esterilidad de la plaga.

La presente divulgación encuentra aplicación en cualquier área donde sea deseable inhibir la viabilidad, el crecimiento, el desarrollo o la reproducción de una plaga, o disminuir la patogenicidad o infectividad de una plaga. Las aplicaciones prácticas incluyen, pero sin limitación, (1) protección de las plantas contra la infestación por plagas; (2) el uso farmacéutico o veterinario en seres humanos y en animales (por ejemplo para controlar, tratar o prevenir las infecciones por insectos en seres humanos y en animales); (3) proteger a los materiales contra los daños causados por las plagas; y (4) proteger a los materiales perecederos (tales como comestibles, semillas, etc.) contra los daños causados por las plagas.

La administración o exposición de una molécula de ácido ribonucleico bicatenario a una plaga da como resultado uno o más de los siguientes atributos: reducción en la alimentación por la plaga, reducción en la viabilidad de la plaga, muerte de la plaga, inhibición o diferenciación y desarrollo de la plaga, ausencia o capacidad reducida de la reproducción sexual por la plaga, formación de músculos, formación de hormona juvenil, regulación de hormona juvenil, regulación y transporte de iones, mantenimiento del potencial de la membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación del esperma, síntesis de feromonas, percepción de feromonas, formación de antenas, formación de alas, formación de patas, desarrollo y diferenciación, formación de huevos, maduración larvaria, formación de enzimas digestivas, síntesis de hemolinfa, mantenimiento de la hemolinfa, neurotransmisión, división celular, metabolismo energético, respiración, apoptosis y cualquier componente de la estructura citoesquelética de una célula eucariota, tales como, por ejemplo, actinas y tubulinas. Uno cualquiera o cualquier combinación de estos atributos puede dar como resultado una inhibición eficaz de la infestación por la plaga.

Todos los términos técnicos empleados en esta memoria descriptiva se usan de manera común en bioquímica, biología molecular y agricultura; de este modo, se entienden por los expertos en el campo al que pertenece esta divulgación. Estos términos técnicos pueden encontrarse, por ejemplo, en: MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª ed., Vol. 1 (-3), ed. Sambrook y Russel, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, ed. Ausubel et al., Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience, Nueva York, 1988 (con actualizaciones periódicas); SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY: A COMPENDIUM OF METHODS FROM CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 5ª ed., Vol. 1 (-2), ed. Ausubel et al., John Wiley & Sons, Inc., 2002; GENOME ANALYSIS: A LABORATORY MANUAL, Vol. 1-2, ed. Green et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1997.

Se describen varias técnicas usando PCR, por ejemplo, en Innis et al., PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Academic Press, San Diego, 1990 y en Dieffenbach y Dveksler, PCR PRIMER: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2003. Los pares de cebadores de PCR pueden derivarse de secuencias conocidas mediante técnicas conocidas, tales como el uso de programas informáticos previstos para ese fin, por ejemplo, Primer, versión 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA. Los métodos para la síntesis química de ácidos nucleicos se discuten, por ejemplo, en Beaucage y Caruthers, Tetra. Letts. 22: 1859-62 (1981) y Matteucci y Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 103: 3185 (1981).

Las digestiones con enzimas de restricción, fosforilaciones, ligamientos y transformaciones se efectuaron tal como se describe en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press. Todos los reactivos y materiales usados para el crecimiento y mantenimiento de células bacterianas se obtuvieron a través de Aldrich Chemicals (Milwaukee, Wis.), DIFCO Laboratories (Detroit, Mich.), Invitrogen (Gaithersburg, Md.), o Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.) a menos que se especifique lo contrario.

La **actividad biológica** se refiere al comportamiento biológico y los efectos de una proteína o péptido y sus manifestaciones en una plaga. Por ejemplo, un ARNi puede evitar la traducción de un ARNm particular, inhibiendo de este modo la actividad biológica de la proteína codificada por el ARNm u otra actividad biológica de la plaga.

En la presente descripción, una molécula de ARNi puede inhibir una actividad biológica en una plaga, dando como resultado uno o más de los siguientes atributos: reducción en la alimentación por la plaga, reducción en la viabilidad

de la plaga, muerte de la plaga, inhibición o diferenciación y desarrollo de la plaga, ausencia o capacidad reducida de la reproducción sexual por la plaga, formación de músculos, formación de hormona juvenil, regulación de hormona juvenil, regulación y transporte de iones, mantenimiento del potencial de la membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación del esperma, síntesis de feromonas, percepción de feromonas, formación de antenas, formación de alas, formación de patas, desarrollo y diferenciación, formación de huevos, maduración larvaria, formación de enzimas digestivas, síntesis de hemolinfa, mantenimiento de la hemolinfa, neurotransmisión, división celular, metabolismo energético, respiración, apoptosis y cualquier componente de la estructura citoesquelética de una célula eucariota, tales como, por ejemplo, actinas y tubulinas.

ADN complementario (ADNc) se refiere a un ADN monocatenario sintetizado a partir de un molde de ARNm maduro. Aunque hay varios métodos, el ADNc se sintetiza más frecuentemente a partir de ARNm maduro (completamente cortado y empalmado) usando la enzima transcriptasa inversa. Esta enzima actúa sobre una sola hebra de ARNm, generando su ADN complementario basándose en el emparejamiento de pares de bases de ARN (A, U, G, C) a sus complementos de ADN (T, A, C, G). Dos hebras de ácido nucleico son **sustancialmente complementarias** cuando se emparejan al menos un 85 % de sus bases.

Polinucleótido deseado: un polinucleótido deseado es un elemento genético, tal como un promotor, potenciador, o terminador, o un gen o un polinucleótido que se va a transcribir y/o traducir en una célula transformada que comprende el polinucleótido deseado en su genoma. Si el polinucleótido deseado comprende una secuencia que codifica un producto proteico, la región codificante puede unirse operativamente a elementos reguladores, tales como a un promotor y a un terminador, que producen la expresión de un transcrito de ARN mensajero asociado y/o un producto proteico codificado por el polinucleótido deseado. Por lo tanto, un "polinucleótido deseado" puede comprender un gen que está unido operativamente en la orientación 5' a 3' a un promotor, un gen que codifica una proteína y un terminador. Como alternativa, el polinucleótido deseado puede comprender un gen o un fragmento del mismo, en una orientación "sentido" o "antisentido", cuya transcripción produce ácidos nucleicos que pueden afectar a la expresión de un gen endógeno en la célula hospedadora. Un polinucleótido deseado también puede producir tras la transcripción un producto de ARN bicatenario tras lo que se inicia la interferencia de ARN de un gen al que se asocia el polinucleótido deseado. Un polinucleótido deseado puede posicionarse en un vector, de tal forma que las secuencias del límite izquierdo y derecho flanquean o se encuentran a cada lado del polinucleótido deseado. La presente divulgación prevé la integración estable de uno o más polinucleótidos deseados en el genoma de al menos una célula hospedadora. Un polinucleótido deseado puede estar mutado o ser una variante de su secuencia de tipo silvestre. Se entiende que la totalidad o parte del polinucleótido deseado puede integrarse en el genoma de un hospedador. También se entiende que la expresión "polinucleótido deseado" abarca uno o más de dichos polinucleótidos. Por lo tanto, un vector puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más polinucleótidos deseados.

La **"exposición"** incluye cualquier método mediante el cual una plaga puede ponerse en contacto con un ARNbc, comprendiendo el ARNbc cadenas complementarias hibridadas, teniendo una de ellas una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos parte de la secuencia de nucleótidos de un gen diana de plaga que se regula de modo negativo. Una plaga puede exponerse al ARNbc por captación directa (por ejemplo, a través de la alimentación), lo que no requiere la expresión del ARNbc en la plaga. Como alternativa, una plaga puede ponerse en contacto directo con una composición que comprenda el ARNbc. Por ejemplo, una plaga puede ponerse en contacto con una superficie o un material tratado con una composición que comprenda un ARNbc. Una célula hospedadora procarionta (por ejemplo, pero sin limitación, una bacteria) o eucariota (por ejemplo, pero sin limitación, una levadura) o un organismo hospedador, puede expresar un ARNbc.

Exógeno: "exógeno", en referencia a un ácido nucleico, significa que ese ácido nucleico se deriva de organismos no hospedadores. El ADN o ARN exógeno representa ácidos nucleicos que son de origen natural en la composición genética de hongos, bacterias, virus, mamíferos, peces o aves, pero que no son de origen natural en el hospedador que se va a transformar. Por lo tanto, un ácido nucleico exógeno es uno que codifica, por ejemplo, un polipéptido que no se produce de manera natural por el hospedador transformado. Un ácido nucleico exógeno no tiene por qué codificar un producto proteico.

Gen: se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende secuencias de control y codificantes necesarias para la producción de un polipéptido o precursor. El polipéptido puede estar codificado por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante. Un gen puede constituir una secuencia codificante no interrumpida o puede incluir uno o más intrones, unidos por las uniones de corte y empalme adecuadas. Además, un gen puede contener una o más modificaciones bien en las regiones codificantes o no traducidas que podrían afectar a la actividad biológica o a la estructura química del producto de expresión, a la velocidad de expresión o al modo de control de la expresión. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, mutaciones, inserciones, eliminaciones y sustituciones de uno o más nucleótidos. En este sentido, dichos genes modificados pueden citarse como "variantes" del gen "nativo".

Elemento genético: un "elemento genético" es cualquier secuencia nucleotídica discreta, tal como, pero sin limitación, un promotor, gen, terminador, intrón, potenciador, espaciador, región 5' no traducida, región 3' no traducida, o sitio de reconocimiento de recombinasa.

Modificación genética: introducción estable de un ácido nucleico en el genoma de determinados organismos aplicando métodos de biología molecular y celular.

La "**supresión génica**" o "regulación negativa de la expresión génica" o "inhibición de la expresión génica" se usan de manera intercambiable y se refieren a una reducción medible u observable en la expresión génica o una supresión completa detectable de la expresión génica, al nivel de producto proteico y/o producto de ARNm del gen diana. La regulación negativa o inhibición de la expresión génica es "específica" cuando la regulación negativa o la inhibición del gen diana sucede sin efectos evidentes en otros genes de la plaga.

Dependiendo de la naturaleza del gen diana, la regulación negativa o la inhibición de la expresión génica en las células de una plaga puede confirmarse mediante análisis fenotípico de la célula o de la plaga completa o midiendo el ARNm o la expresión proteica usando técnicas moleculares, tales como hibridación de solución de ARN, protección de nucleasas, hibridación de Northern, retrotranscripción, control de la expresión génica con una micromatriz, unión de anticuerpos, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), otros inmunoensayos o análisis de células activadas por fluorescencia (FACS).

Gimnosperma, tal como se usan en el presente documento, se refiere a una planta de semilla que porta semillas sin ovarios. Los ejemplos de gimnospermas incluyen coníferas, cícadas, ginkgos y efedras.

Homología, tal como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias. Es posible que las secuencias de proteínas o nucleótidos sean homólogas si muestran un nivel "significativo" de similitud de secuencia o más preferentemente de identidad de secuencia. Las secuencias realmente homólogas están relacionadas por la divergencia a partir de un gen antecesor común. Los homólogos de secuencia pueden ser de dos tipos: (i) en los casos donde existen homólogos en diferentes especies se conocen como ortólogos. Por ejemplo, los genes de α -globina en ser humano y ratón son ortólogos; (ii) los parálogos son genes homólogos en una sola especie. Por ejemplo, los genes de α - y β -globina en ratón son parálogos.

Una **célula hospedadora** se refiere a un microorganismo, a una célula procariota, a una célula eucariota, o a una línea celular cultivada como una entidad unicelular que puede usarse, o se ha usado como receptor para un vector recombinante u otra transferencia de polinucleótidos, e incluye la descendencia de la célula original que se ha transfectedo. La descendencia de una célula individual puede no ser necesariamente completamente idéntica en su morfología en su genómica o en el complemento de ADN total que el progenitor original debido a mutaciones naturales, accidentales o deliberadas.

Introducción: tal como se usan en el presente documento, se refiere a la inserción de una secuencia de ácido nucleico en una célula, mediante métodos que incluyen infección, transfección, transformación o transducción.

Las **plagas de insectos** tal como se usan en el presente documento incluyen, pero sin limitación:

del orden *Lepidoptera*, por ejemplo, *Acleris* spp., *Adoxophyes* spp., *Aegeria* spp., *Agrotis* spp., *Alabama argillaceae*, *Amylois* spp., *Anticarsia gemmatalis*, *Archips* spp., *Argyrotaenia* spp., *Autographa* spp., *Busseola fusca*, *Cadra cautella*, *Carposina nipponensis*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocrocis* spp., *Cnephasia* spp., *Cochylis* spp., *Coleophora* spp., *Crocidolomia binotalis*, *Cryptophlebia leucotreta*, *Cydia* spp., *Diatraea* spp., *Diparopsis castanea*, *Earias* spp., *Ephestia* spp., *Eucosma* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Grapholita* spp., *Hedya nubiferana*, *Heliothis* spp., *Hellula undalis*, *Hyphantria cunea*, *Keferia lycopersicella*, *Leucoptera scitella*, *Lithocollethis* spp., *Lobesia botrana*, *Lymantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma* spp., *Mamestra brassicae*, *Manduca sexta*, *Operophtera* spp., *Ostrinia Nubilalis*, *Pammene* spp., *Pandemis* spp., *Panolis flammea*, *Pectinophora gossypiella*, *Phthorimaea operculella*, *Pieris rapae*, *Pieris* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Scirpophaga* spp., *Sesamia* spp., *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Synanthedon* spp., *Thaumetopoea* spp., *Tortrix* spp., *Trichoplusia ni* y *Yponomeuta* spp.; del orden *Coleoptera*, por ejemplo, *Agriotes* spp., *Anthonomus* spp., *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites* spp., *Curculio* spp., *Dermestes* spp., *Epilachna* spp., *Eremnus* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptrus* spp., *Melolontha* spp., *Orycaephilus* spp., *Otiorynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes* spp., *Rhizopertha* spp., *Scarabeidae*, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp., *Tenebrio* spp., *Tribolium* spp. y *Trogoderma* spp.; del orden *Orthoptera*, por ejemplo, *Blatta* spp., *Blattella* spp., *Gryllotalpa* spp., *Leucophaea maderae*, *Locusta* spp., *Periplaneta* ssp. y *Schistocerca* spp.; del orden *Isoptera*, por ejemplo, *Reticulitermes* ssp; del orden *Psocoptera*, por ejemplo, *Liposcelis* spp.; del orden *Anoplura*, por ejemplo, *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Pemphigus* spp. y *Phylloxera* spp.; del orden *Mallophaga*, por ejemplo, *Damalinea* spp. y *Trichodectes* spp.; del orden *Thysanoptera*, por ejemplo, *Franklinella* spp., *Hercinothrips* spp., *Taeniothrips* spp., *Thrips palmi*, *Thrips tabaci* y *Scirtothrips aurantii*; del orden *Heteroptera*, por ejemplo, *Cimex* spp., *Distantiella theobroma*, *Dysdercus* spp., *Euchistus* spp., *Eurygaster* spp., *Leptocoris* spp., *Nezara* spp., *Piesma* spp., *Rhodnius* spp., *Sahlbergella singularis*, *Scotinophara* spp., *Triatoma* spp., familia *Miridae* spp. tales como *Lygus hesperus* y *Lygus lineolaris*, familia *Lygaeidae* spp. tales como *Blissus leucopterus* y familia *Pentatomidae* spp.; del orden *Homoptera*, por ejemplo, *Aleurothrixus floccosus*, *Aleyrodes brassicae*, *Aonidiella* spp., *Aphididae*, *Aphis* spp., *Aspidiotus* spp., *Bemisia tabaci*, *Ceroplaster* spp., *Chrysomphalus aonidium*, *Chrysomphalus dictyospermi*, *Coccus hesperidum*, *Empoasca* spp., *Eriosoma larigerum*, *Erythroneura* spp., *Gascardia* spp., *Laodelphax* spp., *Lacanium corni*, *Lepidosaphes* spp., *Macrosiphus* spp., *Myzus* spp., *Nehotettix* spp., *Nilaparvata* spp., *Paratoria* spp., *Pemphigus* spp., *Planococcus* spp., *Pseudaulacaspis* spp., *Pseudococcus* spp., *Psylla* ssp.,

5 *Pulvinaria aethiopica*, *Quadraspidiotus* spp., *Rhopalosiphum* spp., *Saissetia* spp., *Scaphoideus* spp., *Schizaphis* spp., *Sitobion* spp., *Trialeurodes vaporariorum*, *Trioza erytraeae* y *Unaspis citri*; del orden Hymenoptera, por ejemplo, *Acromyrmex*, *Atta* spp., *Cephus* spp., *Diprion* spp., *Diprionidae*, *Gilpinia polytoma*, *Hoplocampa* spp., *Lasius* spp., *Monomorium pharaonis*, *Neodiprion* spp., *Solenopsis* spp. y *Vespa* spp.; del orden Diptera, por ejemplo, *Aedes* spp., *Antherigona soccata*, *Bibio hortulanus*, *Calliphora erythrocephala*, *Ceratitis* spp., *Chrysomyia* spp., *Culex* spp., *Cuterebra* spp., *Dacus* spp., *Drosophila melanogaster*, *Fannia* spp., *Gastrophilus* spp., *Glossina* spp., *Hypoderma* spp., *Hyppobosca* spp., *Liriomyza* spp., *Lucilia* spp., *Melanagromyza* spp., *Musca* spp., *Oestrus* spp., *Orseolia* spp., *Oscinella frit*, *Pegomyia hyoscyami*, *Phorbia* spp., *Rhagoletis pomonella*, *Sciara* spp., *Stomoxys* spp., *Tabanus* spp., *Tannia* spp. y *Tipula* spp., del orden Siphonaptera, por ejemplo, *Ceratophyllus* spp. y *Xenopsylla cheopis* y del orden *Thysanura*, por ejemplo, *Lepisma saccharina*.

Una **planta monocotiledónea (monocot)** es una planta de flor que tiene embriones con un cotiledón u hoja de semilla, venas foliares paralelas y partes de flor en múltiplos de tres. Los ejemplos de monocotiledóneas incluyen, pero sin limitación, césped, maíz, arroz, avena, trigo, cebada, sorgo, orquídea, iris, lirio, cebolla y palmera.

15 **Plaga o plaga diana** se refiere a insectos, arácnidos, crustáceos, hongos, bacterias, virus, nematodos, platelmintos, lombrices, oxiuros, anquilosomas, tenias, tripanosomas, esquistosomas, moscardones, pulgas, garrapatas, ácaros y piojos y similares que son parásitos en el ambiente humano. Una plaga puede ingerir o entrar en contacto con una o más células, tejidos, o productos producidos por un organismo transformado con un agente de supresión génica bicatenario, así como un material o una superficie tratada con un agente de supresión génica bicatenario.

20 **Los nematodos**, o lombrices, son uno de los phylums de animales más comunes, con más de 20.000 especies diferentes descritas (más de 15.000 son parásitas). Son ubicuos en ambientes de agua dulce, marinos y terrestres, donde generalmente superan en número a otros animales en cuando al recuento de individuos y de especies y se encuentran en localizaciones tan diversas como la Antártida y fosas oceánicas. Además, hay muchas formas parásitas, incluyendo patógenos en la mayoría de plantas y animales.

25 Las plagas de nematodos de interés particular incluyen, por ejemplo, *A. caninum*, *A. ceylancium*, *H. contortus*, *O. ostertagi*, *C. elegans*, *C. briggsae*, *P. pacificus*, *S. stercoralis*, *S. ratti*, *P. trichosuri*, *M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. paraensis*, *G. rostochiensis*, *G. pallida*, *H. glycines*, *H. schattii*, *P. penetrans*, *P. vulnus*, *R. similis*, *Z. punctata*, *A. suum*, *T. canis*, *B. malayi*, *D. immitis*, *O. volvulus*, *T. vulpis*, *T. spiralis*, *X. index*. *A. duodenale*, *A. lumbricoides*, así como especies de los siguientes géneros: *Aphelenchoides*, *Nacobbus*, *Ditylenchus*, *Longidorus*, *Trichodorus* y *Bursaphelenchus*.

30 Una **célula normal** se refiere a una célula de un fenotipo no transformado o que muestra una morfología de una célula no transformada del tipo de tejido que se está examinando.

Unido operativamente: combinar dos o más moléculas de tal modo que en combinación funcionan adecuadamente en una célula. Por ejemplo, un promotor se une operativamente a un gen estructural cuando el promotor controla la transcripción del gen estructural.

35 Los **ortólogos** son genes que están relacionados por descendencia vertical de un ancestro común y codifican proteínas con la misma función en especies diferentes. Debido a su separación después de un suceso de especiación, los ortólogos pueden divergir, pero normalmente tienen similitudes a niveles de secuencia y de estructura. Dos genes que se derivan de un ancestro común y codifican proteínas con función similar se citan como ortólogos. La identificación de ortólogos es crítica para hacer predicciones fiables de la función génica en genomas recién secuenciados.

40 Un **"agente para el control de plagas"** o un **"agente de supresión génica"** se refiere a una molécula particular de ARN que comprende un primer segmento de ARN y un segundo segmento de ARN, en el que la complementariedad entre el primer y el segundo segmento de ARN da como resultado la capacidad de los dos segmentos para que hibriden *in vivo* e *in vitro* para formar una molécula bicatenaria. Generalmente, puede ser preferible incluir un tercer segmento de ARN que enlace y establezca a la primera y segunda secuencia de tal forma que puede formarse un tallo unido junto a un extremo de cada uno del primer y el segundo segmento por el tercer segmento para formar un bucle, de tal forma que la estructura completa forma una estructura de tallo y bucle, o las estructuras que hibridan de una manera más estrechas pueden formar una estructura de tallo-bucle anudada. Como alternativa, podría formarse una horquilla simétrica sin un tercer segmento en el que no se ha diseñado un bucle, pero que por razones estéricas una horquilla podría formar su propio bucle cuando el tallo es lo suficientemente largo como para estabilizarse por sí mismo. El primer y el segundo segmento de ARN se encontrará generalmente entre la longitud de la molécula de ARN y será una repetición sustancialmente invertida del otro y se unen juntos mediante el tercer segmento de ARN. El primer y el segundo segmento corresponde invariablemente y no respectivamente a una secuencia sentido y una antisentido respecto del ARN transcrito a partir del gen diana en la plaga de insecto diana que se suprime por la ingestión de la molécula de ARNbc.

El agente de control de plagas puede ser una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada (o aislada) y más específicamente moléculas de ácido nucleico o fragmentos de moléculas de ácido nucleico de las mismas de un ADN genómico (ADNg) o una biblioteca de ADNc. Como alternativa, los fragmentos pueden comprender

oligonucleótidos más pequeños que tengan de aproximadamente 15 a aproximadamente 250 restos de nucleótidos y más preferentemente, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 restos de nucleótidos.

5 Un **pesticida** se refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias pensadas para prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga. Un pesticida puede ser una sustancia química o un agente biológico, usada contra plagas incluyendo insectos, patógenos, malas hierbas, nematodos y microbios que compiten con los humanos por la comida, destruyen la propiedad, esparcen enfermedades o son una molestia.

10 El **fenotipo** es un rasgo o característica distintiva de un organismo, que puede alterarse integrando uno o más "polinucleótidos deseados" y/o marcadores de selección/exploración en el genoma de al menos una célula de un organismo transformado. Los "polinucleótidos deseados" y/o marcadores pueden conferir un cambio en el fenotipo de un organismo transformado, modificando una cualquiera de una serie de características o propiedades genéticas, moleculares, bioquímicas, fisiológicas o morfológicas de la célula o organismo transformado en su conjunto.

15 **Planta y tejido vegetal:** una "planta" es cualquiera de los diversos organismos fotosintéticos, eucariotas y multicelulares del reino *Plantae* que de manera característica producen embriones, contienen cloroplastos y tienen paredes celulares de celulosa. Una parte de una planta, es *decir*, un "tejido de planta" puede tratarse de acuerdo con los métodos de la presente divulgación para prevenir intestaciones por plagas de la planta o de la parte de la planta. Pueden tratarse muchos tejidos de plantas e incluyen, pero sin limitación, embriones somáticos, polen, hojas, tallos, callos, estolones, microtubérculos y brotes. Por lo tanto, la presente divulgación prevé el tratamiento de plantas angiospermas y gimnospermas tales como acacia, alfalfa, manzana, albaricoque, alcachofa, fresno, espárrago, aguacate, banana, cebada, judía, remolacha, abedul, haya, mora, arándano, brécol, coles de Bruselas, repollo, colza, cantalupo, zanahoria, mandioca, coliflor, cedro, un cereal, apio, castaña, cereza, col china, cítricos, clementinas, trébol, café, maíz, algodón, caupí, pepino, ciprés, berenjena, olmo, endivia, eucalipto, hinojo, higos, abeto, geranio, uva, pomelo, cacahuete, cereza de suelo, cicuta, nogal americano, con rizada, kiwi, colinabo, alerce, lechuga, puerro, limón, lima, algarroba, pino, culantrillo, maíz, mango, arce, melón, mijo, champiñón, mostaza, nuez, roble, avena, okra, cebolla naranja, una planta, flor o árbol ornamental, papaya, palma, perejil, chirivía, guisante, melocotón, cacahuete, pera, turba, pimienta, caqui, guandul, pino, piña, plátano, ciruela, granada, patata, calabaza, achicoria, rábano, colza, frambuesa, arroz, centeno, sorgo, sauce, soja, espinaca, píceas, calabaza, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, batata, maíz dulce, mandarina, té, tabaco, tomate, árboles, tritical, céspedes, nabo, una vid, nogal, berro, sandía, trigo, batata, tejo y calabacín.

30 De acuerdo con la presente divulgación, un "tejido de planta" también abarca células vegetales. Las células vegetales incluyen cultivos en suspensión, callos, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen, semillas y microesporas. Los tejidos de plantas pueden estar en varios estados de madurez y pueden crecerse en cultivo líquido o sólido, o en suelo o medio adecuado en macetas, invernaderos o campos. Un tejido de planta también se refiere a cualquier clon de dicha planta, semilla, descendencia, propágulo ya se genere sexual o asexualmente y los descendientes de cualquiera de estos, tales como esquejes o semillas.

35 **Promotor:** pretende significar un ácido nucleico, preferentemente ADN que se une a ARN polimerasa y/o a otros elementos reguladores de la transcripción. Como con cualquier promotor, los promotores facilitarán o controlarán la transcripción del ADN o ARN para generar una molécula de ARNm a partir de una molécula de ácido nucleico que está unida operativamente al promotor. Tal como se ha afirmado anteriormente, el ARN generado puede codificar una proteína o polipéptido o puede codificar un ARN de interferencia, o una molécula antisentido.

40 Un **polinucleótido** es una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia génica codificante o un fragmento de la misma, un promotor, un intrón, una región potenciadora, un sitio de poliadenilación, un sitio de inicio de la traducción, regiones 5' o 3' no traducidas, un gen indicador, un marcador de selección o similares. El polinucleótido puede comprender ADN o ARN monocatenario o bicatenario. El polinucleótido puede comprender bases modificadas o una estructura modificada. El polinucleótido puede ser genómico, un transcrito de ARN (tal como ARNm) o una secuencia nucleotídica procesada (tal como un ADNc). El polinucleótido puede comprender una secuencia en orientación sentido o antisentido.

50 Un **polinucleótido aislado** es una secuencia polinucleotídica que no está en su estado nativo, por ejemplo, el polinucleótido está compuesto de una secuencia nucleotídica no encontrada en la naturaleza o el polinucleótido está separado de secuencias nucleotídicas con las que está típicamente en proximidad o está próximo a secuencias nucleotídicas con las que típicamente no está en proximidad.

Una **secuencia nucleotídica recombinante** se refiere a una molécula de ácido nucleico que contiene una modificación diseñada por ingeniería genética mediante manipulación por mutagénesis, enzimas de restricción y similares.

55 **Interferencia de ARN (ARNi)** se refiere a la supresión específica de secuencia o específica de gen de la expresión génica (síntesis de proteínas) que está mediada por ARN pequeño interferente (**ARNpi**).

Identidad de secuencia: tal como se usa en el presente documento, la "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico incluye referencia a los restos en las dos secuencias que son iguales

cuando se alinean para máxima correspondencia a lo largo de una región específica.

Tal como se usa en el presente documento, el porcentaje de identidad de secuencia significa el valor determinado al comparar dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de una ventana de comparación, en el que la porción de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) 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 que aparece la base de ácido nucleico idéntica en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

La "identidad de secuencia" tiene un significado reconocido en la técnica y puede calcularse usando técnicas publicadas. Véase COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, ed. (Oxford University Press, 1988), BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, ed. (Academic Press, 1993), COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PARTE I, Griffin y Griffin, eds., (Humana Press, 1994), SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, Von Heinje ed., Academic Press (1987), SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribskov y Devereux, eds. (Macmillan Stockton Press, 1991) y Carillo y Lipton, SIAM J. Applied Math. 48: 1073 (1988). Los métodos empleados comúnmente para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, aquellos divulgados en GUIDE TO HUGE COMPUTERS, Bishop, ed., (Academic Press, 1994) y Carillo y Lipton, *anteriormente citado*. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas informáticos. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, al paquete informático GCG (Devereux et al., Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul et al, J. Mol. Biol. 215: 403 (1990)) y FASTDB (Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6: 237 (1990)).

Los ARN de horquilla corta (ARNhc) son ARN monocatenarios que tienen un alto grado de estructura secundaria, de tal forma que una porción de la hebra de ARN forma un bucle de horquilla.

ARN pequeño interferente (ARNpi) se refiere a moléculas de ARN bicatenario de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que se nombran por su capacidad para interferir de manera específica con la expresión génica de proteínas.

Una **secuencia diana** se refiere a una secuencia nucleotídica en una plaga que se selecciona para su supresión o inhibición mediante tecnología de ARN bicatenario. Una secuencia diana codifica una característica o actividad biológica esencial en una plaga.

Terminadores transcripcionales: Las construcciones de expresión de ADN tienen típicamente una región de terminación transcripcional en el extremo opuesto de la región reguladora del inicio de la transcripción. La región de terminación puede seleccionarse para estabilidad del ARNm para potenciar la expresión y/o para la adición de colas de poliadenilación añadidas al producto de transcripción génica. La traducción de un nuevo polipéptido sufre terminación cuando cualquiera de los tres codones de terminación de cadena entran en el sitio A en el ribosoma. Los codones de terminación de la traducción son UAA, UAG y UGA.

Transformación: Un proceso mediante el cual se inserta de manera estable un ácido nucleico en el genoma de un organismo. La transformación puede suceder en condiciones naturales o artificiales usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico en una célula hospedadora procarionta o eucariota, incluyendo la transformación mediada por microorganismos, infección viral, bigotes, electroporación, microinyección, tratamiento con polietilenglicol, choque térmico, lipofección y bombardeo con micropartículas.

Un **organismo transgénico** comprende al menos una célula en la que un ácido nucleico exógeno se ha integrado de manera estable. Un organismo transgénico es, por ejemplo, una bacteria, o una célula hospedadora eucariota, tal como una levadura, o un organismo hospedador. La bacteria puede seleccionarse del grupo que comprende bacterias Gram negativas y Gram positivas, tales como, pero sin limitación, *Escherichia spp.* (por ejemplo *E. coli*), *Bacillus spp.* (por ejemplo *B. thuringiensis*), *Rhizobium spp.*; *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, etc. La bacteria puede seleccionarse del grupo que comprende *Saccharomyces spp.*, etc.

Variante: una "variante", tal como se usa en el presente documento, pretende indicar una secuencia nucleotídica que se desvía de la secuencia nucleotídica o aminoacídica estándar o dada de un gen o una proteína particular. Los términos "isoforma", "isotipo" y "análogo" también se refieren a formas "variantes" de una secuencia nucleotídica. Una "variante" también puede referirse a un "gen reordenado", tal como aquellos descritos en las patentes asignadas a Maxygen.

Se entiende que la presente divulgación no está limitada a la metodología particular, protocolos, vectores y reactivos, etc., descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento solo se usa con el fin de describir realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente divulgación. Cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen referencia en plural a

menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a "un gen" es una referencia a uno o más genes e incluye equivalentes de los mismos conocidos para los expertos en la materia.

I. Plagas diana

5 La presente divulgación proporciona metodologías y construcciones para controlar las infestaciones por plagas de insectos administrando a, o exponiendo, una plaga una secuencia codificante diana que suprime o inhibe de manera post-transcripcional una función biológica requerida en la plaga. Tal como se usa en el presente documento, el término "plaga" se refiere a insectos, arácnidos, crustáceos, hongos, bacterias, virus, nematodos, platelmintos, lombrices, oxiuros, anquilosomas, tenias, tripanosomas, esquistosomas, moscardones, pulgas, garrapatas, ácaros y piojos y similares que son parásitos en el ambiente humano. Una plaga puede ingerir o entrar en contacto con una o más células, tejidos, o productos producidos por un organismo transformado con un agente de supresión génica bicatenario, así como una superficie o un material tratado con un agente de supresión génica bicatenario.

15 Un rasgo de "resistencia a plagas" es una característica de un hospedador transgénico que hace que el hospedador sea resistente al ataque de una plaga que típicamente inflige daño al hospedador. Dicha resistencia a plagas puede surgir de una mutación natural o más típicamente de la incorporación de ADN recombinante que confiere resistencia a plagas. Para conferir resistencia a plagas a un hospedador transgénico, un ADN recombinante puede, por ejemplo, transcribirse en una molécula de ARN que forma una molécula de ARNbc en los tejidos o fluidos del hospedador recombinante. La molécula de ARNbc está compuesta en parte de un segmento de ARN que es idéntico a un segmento correspondiente de ARN codificado a partir de una secuencia de ADN en una plaga que prefiere alimentarse del hospedador recombinante. La expresión del gen en la plaga diana se suprime por el ARNbc y la supresión de la expresión del gen en la plaga diana da como resultado que el hospedador sea resistente la plaga.

Las plagas adecuadas incluyen cualquier organismo que cause daño a otro organismo. La divulgación contempla plagas de insectos, nematodos y hongos en particular.

25 **Insecto** tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier insecto, lo que significa cualquier organismo que pertenece al reino de los Animales, más específicamente al phylum Arthropoda y a la clase Insecta o a la clase arachnida. Los métodos son aplicables a todos los insectos que son susceptibles de silenciamiento génico mediante interferencia de ARN y que son capaces de internalizar ARN bicatenario a partir de su ambiente inmediato.

30 El insecto puede pertenecer a los siguientes órdenes: Acari, Araneae, Anoplura, Coleoptera, Collembola, Dermaptera, Dictyoptera, Diplura, Diptera, Embioptera, Ephemeroptera, Grylloblatodea, Hemiptera, Homoptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Mecoptera, Neuroptera, Odonata, Orthoptera, Phasmida, Plecoptera, Protura, Psocoptera, Siphonaptera, Siphunculata, Thysanura, Strepsiptera, Thysanoptera, Trichoptera y Zoraptera.

El insecto se selecciona entre el grupo que consiste en:

35 (1) un insecto que es una plaga para plantas, tal como, pero sin limitación *Nilaparvata* spp. (por ejemplo, *N. lugens* (saltamontes marrón)); *Laodelphax* spp. (por ejemplo, *L. striatellus* (saltamontes marrón pequeño)); *Nephotettix* spp. (por ejemplo, *N. virescens* o *N. cincticeps* (saltahojas verde), o *N. nigropictus* (saltahojas del arroz)); *Sogatella* spp. (por ejemplo, *S. furcifera* (saltamontes de dorso blanco)); *Blissus* spp. (por ejemplo, *B. leucopterus leucopterus* (chinche)); *Scotinophora* spp. (por ejemplo, *S. vermidulate* (insecto negro del arroz)); *Acrosternum* spp. (por ejemplo, *A. hilare* (chinche verde)); *Parnara* spp. (por ejemplo, *P. guttata* (saltador del arroz)); *Chilo* spp. (por ejemplo, *C. suppressalis* (barrenador rayado del tallo del arroz), *C. auricilius* (barrenador del tallo de flecos dorados), o *C. polychrysus* (barrenador del tallo de cabeza negra)); *Chilotræa* spp. (por ejemplo, *C. polychrysa* (barrenador del tallo del arroz)); *Sesamia* spp. (por ejemplo, *S. inferens* (barrenador rosa del arroz)); *Tryporyza* spp. (por ejemplo, *T. innotata* (barrenador blanco del arroz), o *T. incertulas* (barrenador amarillo del arroz)); *Cnaphalocrocis* spp. (por ejemplo, *C. medinalis* (enrollador de la hoja del arroz)); *Agromyza* spp. (por ejemplo, *A. osyzae* (mosca minadora), o *A. parvicornis* (mosca minadora de la hoja del maíz)); *Diatraea* spp. (por ejemplo, *D. saccharalis* (barrenador de la caña del azúcar), o *D. grandiosella* (barrenador del maíz del suroeste)); *Narnaga* spp. (por ejemplo, *N. aenescens* (oruga verde del arroz)); *Xanthodes* spp. (por ejemplo, *X. transversa* (oruga verde)); *Spodoptera* spp. (por ejemplo, *S. frugiperda* (gusano cogollero), *S. exigua* (oruga de la remolacha), *S. littoralis* (oruga podadora) o *S. praefica* (oruga podadora de rayas amarillas occidental)); *Mythimna* spp. (por ejemplo, *Mythimna (Pseudaletia) seperata* (oruga negra)); *Helicoverpa* spp. (por ejemplo, *H. zea* (gusano del maíz)); *Colaspis* spp. (por ejemplo, *C. brunnea* (colaspis de la uva)); *Lissorhoptrus* spp. (por ejemplo, *L. oryzophilus* (picudo acuático del arroz)); *Echinocnemus* spp. (por ejemplo, *E. squamos* (picudo de la planta del arroz)); *Diclidispa* spp. (por ejemplo, *D. armigera* (hispa del arroz)); *Oulema* spp. (por ejemplo, *O. oryzae* (escarabajo de la hoja)); *Sitophilus* spp. (por ejemplo, *S. oryzae* (picudo del arroz)); *Pachydiplosis* spp. (por ejemplo, *P. oryzae* (mosquito enano del arroz)); *Hydrellia* spp. (por ejemplo, *H. griseola* (minador pequeño del arroz), o *H. sasakii* (gusano del tallo del arroz)); *Chlorops* spp. (por ejemplo, *C. oryzae* (gusano del arroz)); *Ostrinia* spp. (por ejemplo, *O. nubilalis* (barrenador europeo del maíz)); *Agrotis* spp. (por ejemplo, *A. ipsilon* (gusano cortador negro)); *Elasmopalpus* spp. (por ejemplo, *E. lignosellus* (barrenador menor del tallo del maíz)); *Melanotus* spp. (gusano alambre); *Cyclocephala* spp. (por ejemplo, *C. borealis* (escarabajo rubio del norte), o *C. immaculata* (escarabajo rubio del sur)); *Popillia* spp. (por ejemplo, *P. japonica* (escarabajo japonés));

Chaetocnema spp. (por ejemplo, *C. pulicaria* (escarabajo pulga del maíz)); *Sphenophorus* spp. (por ejemplo, *S. maidis* (picudo del maíz)); *Rhopalosiphum* spp. (por ejemplo, *R. maidis* (pulgón de la hoja del maíz)); *Anuraphis* spp. (por ejemplo, *A. maidiradicis* (pulgón de la raíz del maíz)); *Melanoplus* spp. (por ejemplo, *M. femurrubrum* (saltamontes de patas rojas) *M. differentialis* (saltamontes diferencial) o *M. sanguinipes* (saltamontes migratorio));
 5 *Hylemya* spp. (por ejemplo, *H. platura* (mosca de la semilla del maíz)); *Anaphothrips* spp. (por ejemplo, *A. obscurus* (trips de la hierba)); *Solenopsis* spp. (por ejemplo, *S. milesta* (hormiga ladrona)); o spp. (por ejemplo, *T. urticae* (araña de dos manchas), *T. cinnabarinus* (ácaro carmín); *Helicoverpa* spp. (por ejemplo, *H. zea* (gusano del algodón), o *H. armigera* (gusano de américa)); *Pectinophora* spp. (por ejemplo, *P. gossypiella* (gusano rosa)); *Earias* spp. (por ejemplo, *E. vittella* (gusano manchado)); *Heliothis* spp. (por ejemplo, *H. virescens* (gusano cogollero del tabaco)); *Anthonomus* spp. (por ejemplo, *A. grandis* (grillo de la cápsula del algodónero)); *Pseudatomoscelis* spp. (por ejemplo, *P. seriatus* (pulgá saltona del algodón)); *Trialetrodes* spp. (por ejemplo, *T. abutiloneus* (mosca blanca de alas bandeadas) *T. vaporariorum* (mosca blanca de invernadero)); *Bemisia* spp. (por ejemplo, *B. argentifolii* (mosca blanca de la hoja del tabaco)); *Aphis* spp. (por ejemplo, *A. gossypii* (pulgón del algodón), *A. mellifera*); *Lygus* spp. (por ejemplo, *L. lineolaris* (chinche manchadora) o *L. hesperus* (chinche manchadora occidental)); *Euschistus* spp. (por ejemplo, *E. conspersus* (chinche conspersa)); *Chlorochroa* spp. (por ejemplo, *C. sayi* (chinche de Say));
 15 *Nezara* spp. (por ejemplo, *N. viridula* (chinche verde del sur)); *Thrips* spp. (por ejemplo, *T. tabaci* (trips de la cebolla)); *Frankliniella* spp. (por ejemplo, *F. fusca* (trips del tabaco), o *F. occidentalis* (trips occidental de la flor)); *Leptinotarsa* spp. (por ejemplo, *L. decemlineata* (escarabajo de la patata de Colorado), *L. juncta* (falso escarabajo de la patata), o *L. texana* (falso escarabajo de la patata de Texas)); *Lema* spp. (por ejemplo, *L. trilineata* (escarabajo de la patata de tres líneas)); *Epitrix* spp. (por ejemplo, *E. cucumeris* (escarabajo pulga de la patata), *E. hirtipennis* (escarabajo pulga), o *E. tuberos* (escarabajo pulga de tubérculos)); *Epicauta* spp. (por ejemplo, *E. vittata* (escarabajo ampolla de rayas)); *Empoasca* spp. (por ejemplo, *E. fabae* (saltahojas de la patata)); *Myzus* spp. (por ejemplo, *M. persicae* (pulgón verde del melocotón)); *Paratrioza* spp. (por ejemplo, *P. cockerelli* (psílido)); *Conoderus* spp. (por ejemplo, *C. falli* (gusano de alambre de la patata del sur), o *C. vespertinus* (gusano de alambre del tabaco));
 25 *Phthorimaea* spp. (por ejemplo, *P. operculella* (polilla de la patata)); *Macrosiphum* spp. (por ejemplo, *M. euphorbiae* (pulgón de la patata)); *Thyanta* spp. (por ejemplo, *T. pallidovirens* (chinche de hombros rojos)); *Phthorimaea* spp. (por ejemplo, *P. operculella* (polilla de la patata)); *Helicoverpa* spp. (por ejemplo, *H. zea* (gusano del fruto del tomate); *Keiferia* spp. (por ejemplo, *K. lycopersicella* (gusano alfiler del tomate)); *Limonius* spp. (gusanos de alambre); *Manduca* spp. (por ejemplo, *M. sexta* (gusano del tabaco), o *M. quinquemaculata* (gusano del tomate));
 30 *Liriomyza* spp. (por ejemplo, *L. sativae*, *L. trifolii* o *L. huidobrensis* (minador de hojas)); *Drosophilla* spp. (por ejemplo, *D. melanogaster*, *D. yakuba*, *D. pseudoobscura* o *D. simulans*); *Carabus* spp. (por ejemplo, *C. granulatus*); *Chironomus* spp. (por ejemplo, *C. tentanus*); *Ctenocephalides* spp. (por ejemplo, *C. felis* (pulga del gato)); *Diaprepes* spp. (por ejemplo, *D. abbreviatus* (picudo de la raíz)); *Ips* spp. (por ejemplo, *I. pini* (horador del pino)); *Tribolium* spp. (por ejemplo, *T. castaneum* (escarabajo de suelo rojo)); *Glossina* spp. (por ejemplo *G. morsitans* (mosca tse-tsé)); *Anopheles* spp. (por ejemplo, *A. gambiae* (mosquito de la malaria)); *Helicoverpa* spp. (por ejemplo, *H. armigera* (gusano africano)); *Acyrtosiphon* spp. (por ejemplo, *A. pisum* (pulgón del guisante)); *Apis* spp. (por ejemplo, *A. mellifera* (abeja melífera)); *Homalodisca* spp. (por ejemplo, *H. coagulata* (chicharrita de alas cristalinas)); *Aedes* spp. (por ejemplo, *Ae. aegypti* (mosquito de la fiebre amarilla)); *Bombyx* spp. (por ejemplo, *B. mori* (gusano de la seda), *B. mandarina*); *Locusta* spp. (por ejemplo, *L. migratoria* (langosta migratoria)); *Boophilus* spp. (por ejemplo, *B. microplus* (pulga del ganado)); *Acanthoscurria* spp. (por ejemplo, *A. gomesiana* (tarántula chocolate de pelo rojo)); *Diploptera* spp. (por ejemplo, *D. punctata* (cucaracha escarabajo del pacífico)); *Heliconius* spp. (por ejemplo, *H. erato* (mariposa roja de la flor de la pasión) o *H. melpomene* (mariposa de postman)); *Curculio* spp. (por ejemplo, *C. glandium* (picudo de la bellota)); *Plutella* spp. (por ejemplo, *P. xylostella* (polilla de la col)); *Amblyomma* spp. (por ejemplo, *A. variegatum* (pulga del ganado)); *Anteraea* spp. (por ejemplo, *A. yamamai* (polilla de la seda)); *Belgica* spp. (por ejemplo, *B. antarctic*), *Bemisa* spp. (por ejemplo, *B. tabaci*), *Bicyclus* spp., *Biphillus* spp., *Callosobruchus* spp., *Choristoneura* spp., *Cicindela* spp., *Culex* spp., *Culicoides* spp., *Diaphorina* spp., *Diaprepes* spp., *Euclidia* spp., *Glossina* spp., *Gryllus* spp., *Hydropsyche* spp., *Julodis* spp., *Lonomia* spp., *Lutzomyia* spp., *Lysiphebus* spp., *Meladema* spp., *Mycetophagus* spp., *Nasonia* spp., *Oncometopia* spp., *Papilio* spp., *Pediculus* spp., *Plodia* spp., *Rhynchosciara* spp., *Sphaerius* spp., *Toxoptera* spp., *Trichoplusa* spp. y *Armigeres* spp. (por ejemplo, *A. subalbatus*);
 50

(2) un insecto capaz de infestar o dañar a seres humanos y/o a animales tales como, pero sin limitación, aquellos que tienen piezas bucales perforadoras-chupadoras, como las que se encuentran en los hemípteros y en algunos himenópteros y dípteros, tales como mosquitos, abejas, avispas, piojos, pulgas y hormigas, así como en miembros de los arácnidos tales como en garrapatas y ácaros, del orden, clase o familia *Acarina* (garrapatas y ácaros) por ejemplo representantes de las familias *Argasidae*, *Dermanyssidae*, *Ixodidae*, *Psoroptidae* o *Sarcoptidae* y representantes de las especies *Amblyomma* spp., *Anocentor* spp., *Argas* spp., *Boophilus* spp., *Cheyletiella* spp., *Chorioptes* spp., *Demodex* spp., *Dermacentor* spp., *Dermanyssus* spp., *Haemophysalis* spp., *Hyalomma* spp., *Ixodes* spp., *Lynxacarus* spp., *Mesostigmata* spp., *Notoedres* spp., *Ornithodoros* spp., *Ornithonyssus* spp., *Otobius* spp., *otodectes* spp., *Pneumonyssus* spp., *Psoroptes* spp., *Rhipicephalus* spp., *Sarcoptes* spp., o *Trombicula* spp.;
 55 *Anoplura* (piojos chupadores y mordedores) por ejemplo representantes de las especies *Bovicola* spp., *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Menopon* spp., *Pediculus* spp., *Pemphigus* spp., *Phylloxera* spp., o *Solenopotes* spp.; *Diptera* (moscas) por ejemplo representantes de las especies *Aedes* spp., *Anopheles* spp., *Calliphora* spp., *Chrysomyia* spp., *Chrysops* spp., *Cochliomyia* spp., *Culex* spp., *Culicoides* spp., *Cuterebra* spp., *Dermatobia* spp., *Gastrophilus* spp., *Glossina* spp., *Haematobia* spp., *Haematopota* spp., *Hippobosca* spp., *Hypoderma* spp., *Lucilia* spp., *Lyperosia* spp., *Melophagus* spp., *Oestrus* spp., *Phaenicia* spp., *Phlebotomus* spp.,
 60

5 *Phormia* spp., *Sarcophaga* spp., *Simulium* spp., *Stomoxys* spp., *Tabanus* spp., *Tannia* spp. o *Tipula* spp.; Mallophaga (piojo mordedor) por ejemplo representantes de las especies *Damalina* spp., *Felicola* spp., *Heterodoxus* spp. o *Trichodectes* spp.; o *Siphonaptera* (insectos ápteros) por ejemplo representantes de las especies *Ceratophyllus* spp., spp., *Pulex* spp., o *Xenopsylla* spp; Cimicidae (chinchas verdaderas) por ejemplo representantes de las especies *Cimex* spp., *Tritominae* spp., *Rhodnius* spp., o *Triatoma* spp.

y

(3) un insecto que causa daños no deseados a sustratos o a materiales, tales como insectos que atacan a los comestibles, a las semillas, a la madera, a la pintura, al plástico, a textiles, etc.

10 Los métodos de la divulgación son aplicables a todos los nematodos y hongos que sean susceptibles al silenciamiento génico por interferencia de ARN y que puedan internalizar el ARN bicatenario desde su entorno inmediato.

En una realización, el nematodo puede pertenecer a la familia *Heteroderidae*, que incluye los géneros *Heterodera* y *Globodera*.

15 En los métodos y en las realizaciones preferidas, pero sin limitación, de la invención el nematodo se selecciona del grupo que comprende, pero sin limitación:

(1) un nematodo que es un nematodo patógeno para plantas, tales como, sin limitación: *Meloidogyne* spp. (por ejemplo *M. incognita*, *M. javanica*, *M. graminicola*, *M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. hapla* o *M. paranaensis*); *Heterodera* spp. (por ejemplo *H. oryzae*, *H. glycines*, *H. zea* o *H. schachtii*); *Globodera* spp. (por ejemplo *G. pallida* o *G. rostochiensis*); *Rotylenchulus* spp. (por ejemplo *R. reniformis*); *Pratylenchus* spp. (por ejemplo *P. coffeae*, *P. Zeae* o *P. goodeyi*); *Radopholus* spp. (por ejemplo *R. similis*); *Hirschmaniella* spp. (por ejemplo *H. oryzae*); *Ancylostoma* spp. (por ejemplo *A. caninum*, *A. ceylanicum*, *A. duodenale* o *A. tubaeforme*); *Anisakid*; *Aphelenchoides* spp. (por ejemplo *A. Besseyi*); *Ascarids*; *Ascaris* spp., (por ejemplo *A. suum* o *A. lumbricoides*); *Belonolaimus* spp.; *Brugia* spp. (por ejemplo *B. malayi* o *B. pahangi*); *Bursaphelenchus* spp.; *Caenorhabditis* spp. (por ejemplo *C. elegans*, *C. briggsae* o *C. remanei*); *Clostridium* spp. (por ejemplo *C. acetobutylicum*); *Cooperia* spp. (por ejemplo *C. oncophora*); *Criconemoides* spp.; *Cyathostomum* spp. (por ejemplo *C. catinatum*, *C. coronatum* o *C. pateratum*); *Cylicocycclus* spp. (por ejemplo *C. insigne*, *C. nassatus* o *C. radiatus*); *Cylicostephanus* spp. (por ejemplo *C. goldi* o *C. longibursatus*); *Diphyllobothrium*; *Dirofilaria* spp. (por ejemplo *D. immitis*); *Ditylenchus* spp. (por ejemplo *D. dipsaci*, *D. destructor* o *D. Augustus*); *Enterobius* spp. (por ejemplo *E. vermicularis*); *Haemonchus* spp. (por ejemplo *H. contortus*); *Helicotylenchus* spp.; *Hoplolaimus* spp.; *Litomosoides* spp. (por ejemplo *L. sigmodontis*); *Longidorus* spp. (por ejemplo *L. macrosoma*); *Necator* spp. (por ejemplo *N. americanus*); *Nippostrongylus* spp. (por ejemplo *N. brasiliensis*); *Onchocerca* spp. (por ejemplo *O. volvulus*); *Ostertagia* spp. (por ejemplo *O. ostertagi*); *Parastrongyloides* spp. (por ejemplo *P. trichosuri*); *Paratrichodorus* spp. (por ejemplo *P. minor* o *P. teres*); *Parelaphostrongylus* spp. (por ejemplo *P. tenuis*); *Radopholus* spp.; *Scutellonema* spp.; *Strongyloides* spp. (por ejemplo *S. Ratti* o *S. stercoralis*); *Teladorsagia* spp. (por ejemplo *T. circumcincta*); *Toxascaris* spp. (por ejemplo *T. leonina*); *Toxocara* spp. (por ejemplo *T. canis* o *T. cati*); *Trichinella* spp. (por ejemplo *T. britovi*, *T. spiralis* o *T. spirae*); *Trichodorus* spp. (por ejemplo *T. similis*); *Trichuris* spp. (por ejemplo *T. muris*, *T. vulpis* o *T. trichiura*); *Tylenchulus* spp.; *Tylenchorhynchus* spp.; *Uncinaria* spp. (por ejemplo *U. stenocephala*); *Wuchereria* spp. (por ejemplo *W. bancrofti*); *Xiphinema* spp. (por ejemplo *X. Index* o *X. americanum*).

(2) un nematodo capaz de infestar seres humanos tales como, pero sin limitación: *Enterobius vermicularis*, el oxiuro que causa la enterobiasis; *Ascaris lumbricoides*, el ascárido del intestino grueso que causa la ascariasis; *Necator* y *Ancylostoma*, dos tipos de anquilostomas que causan la anquilostomiasis; *Trichuris trichiura*, el tricocéfalo que causa la tricuriasis; *Strongyloides stercoralis* que causa la estrongiloidiasis; y *Trichonella spirae* que causa la triquinosis; *Brugia malayi* y *Wuchereria bancrofti*, los nematodos de la filaria asociados con infecciones causadas por gusanos conocidas como filariasis linfática y su grotesca manifestación, la elefantiasis, y *Onchocerca volvulus* que causa la ceguera del río. La transferencia de nematodos a seres humanos también puede producirse a través de mosquitos hematófagos, que se han alimentado de animales o de seres humanos infectados;

(3) un nematodo capaz de infestar animales tales como, pero sin limitación: perros (anquilostomas, por ejemplo *Ancylostoma caninum* o *Uncinaria stenocephala*, ascáridos, por ejemplo, *Toxocara canis* o *Toxascaris leonina*, o tricocéfalos, por ejemplo, *Trichuris vulpis*), gatos (anquilostomas, por ejemplo, *Ancylostoma tubaeforme*, ascáridos, por ejemplo, *Toxocara cati*), peces (gusanos del arenque o del bacalao por ejemplo *Anisakid*, o céstodos por ejemplo *Diphyllobothrium*), ovejas (elatéridos por ejemplo *Haemonchus contortus*) y ganado (gusanos gastrointestinales por ejemplo *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*);

(4) un nematodo que causa daños no deseados a sustratos o a materiales, tales como nematodos que atacan a comestibles, semillas, madera, pintura, plástico, textiles, etc. Los ejemplos de dichos nematodos se incluyen, pero sin limitación, *Meloidogyne* spp. (por ejemplo *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. graminicola*, *M. chitwoodi* o *M. hapla*); *Heterodera* spp. (por ejemplo *H. oryzae*, *H. glycines*, *H. zea* o *H. schachtii*); *Globodera* spp. (por ejemplo *G. pallida* o *G. rostochiensis*); *Ditylenchus* spp. (por ejemplo *D. dipsaci*, *D. destructor* o *D. angustus*); *Belonolaimus* spp.; *Rotylenchulus* spp. (por ejemplo *R. reniformis*); *Pratylenchus* spp. (por ejemplo *P. coffeae*, *P. goodeyi* o *P.*

zaea); *Radopholus* spp. (por ejemplo *R. Similis*); *Hirschmaniella* spp. (por ejemplo *H. oryzae*); *Aphelenchoide* spp. (por ejemplo *A. besseyi*); *Criconemoides* spp.; *Longidorus* spp.; *Helicotylenchus* spp.; *Hoplolaimus* spp.; *Xiphinema* spp.; *Paratrichodorus* spp. (por ejemplo *P. minor*); *Tylenchorhynchus* spp;

- 5 (5) nematodos transmisores de virus (por ejemplo *Longidorus macrosoma*: transmite el virus de mancha anular necrótica del *Prunus*; *Xiphinema americanum*: transmite el virus de la mancha anular del tabaco, *Paratrichodorus teres*: transmite el virus de la descomposición precoz del guisante, o *Trichodorus similis*: transmite el virus de la necrosis del tabaco).

10 Las plagas fúngicas de particular interés incluyen, pero sin limitación, las siguientes. En una realización, el hongo puede ser un mohó, o más particularmente un hongo filamentoso. En otras realizaciones el hongo puede ser una levadura.

En una realización el hongo puede ser un hongo ascomiceto, es decir, un hongo que pertenece al Phylum *Ascomycota*.

En realizaciones preferidas, pero no limitantes, la célula fúngica se selecciona del grupo que consiste en:

(1) una célula fúngica de, o una célula derivada de un hongo patógeno para plantas, tales como, pero sin limitación,

- 15 *Acremonia* spp., *Alternaria* spp. (por ejemplo *Alternaria brassicola* o *Alternaria solani*), *Ascochyta* spp. (por ejemplo *Ascochyta pisi*), *Botrytis* spp. (por ejemplo *Botrytis cinerea* o *Botryotinia fuckeliana*), *Cladosporium* spp., *Cercospora* spp. (por ejemplo *Cercospora kikuchii* o *Cercospora zaea-maydis*), *Cladosporium* spp. (por ejemplo *Cladosporium fulvum*), *Colletotrichum* spp. (por ejemplo *Colletotrichum lindemuthianum*), *Curvularia* spp., *Diplodia* spp. (por ejemplo *Diplodia maydis*), *Erysiphe* spp. (por ejemplo *Erysiphe graminis f.sp. graminis*, *Erysiphe graminis f.sp. hordei* o *Erysiphe pisi*), *Erwinia amylovora*, *Fusarium* spp. (por ejemplo *Fusarium nivale*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium germinearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme* o *Fusarium roseum*), *Gaeumanomyces* spp. (por ejemplo *Gaeumanomyces graminis f.sp. tritici*), *Gibberella* spp. (por ejemplo *Gibberella zea*), *Helminthosporium* spp. (por ejemplo *Helminthosporium turcicum*, *Helminthosporium carbonum*, *Helminthosporium mavdis* o *Helminthosporium sigmoideum*), *Leptosphaeria salvinii*, *Macrophomina* spp. (por ejemplo *Macrophomina phaseolina*), *Magnaportha* spp. (por ejemplo *Magnaporthe oryzae*), *Mycosphaerella* spp., *Nectria* spp. (por ejemplo *Nectria heamatococca*), *Peronospora* spp. (por ejemplo *Peronospora manshurica* o *Peronospora tabacina*), *Phoma* spp. (por ejemplo *Phoma betae*), *Phakopsora* spp. (por ejemplo *Phakopsora pachyrhizi*), *Phymatotrichum* spp. (por ejemplo *Phymatotrichum omnivorum*), *Phytophthora* spp. (por ejemplo *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora phaseoli*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora megasperma f.sp. soiae* o *Phytophthora infestans*), *Plasmopara* spp. (por ejemplo *Plasmopara viticola*), *Podosphaera* spp. (por ejemplo *Podosphaera leucotricha*), *Puccinia* spp. (por ejemplo *Puccinia sorghi*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia graminis f.sp. tritici*, *Puccinia asparagi*, *Puccinia recondita* o *Puccinia arachidis*), *Pythium* spp. (por ejemplo *Pythium aphanidermatum*), *Pyrenophora* spp. (por ejemplo *Pyrenophora tritici-repentens* o *Pyrenophora teres*), *Pyricularia* spp. (por ejemplo *Pyricularia oryzae*), *Pythium* spp. (por ejemplo *Pythium ultimum*), *Rhizoctonia* spp. (por ejemplo *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia oryzae* o *Rhizoctonia cerealis*), *Rhizopus* spp. (por ejemplo *Rhizopus chinensis*), *Scerotium* spp. (por ejemplo *Scerotium rolfsii*), *Sclerotinia* spp. (por ejemplo *Sclerotinia sclerotiorum*), *Septoria* spp. (por ejemplo *Septoria lycopersici*, *Septoria glycines*, *Septoria nodorum* o *Septoria tritici*), *Thielaviopsis* spp. (por ejemplo *Thielaviopsis basicola*), *Tilletia* spp., *Trichoderma* spp. (por ejemplo *Trichoderma viride*), *Ucinula* spp. (por ejemplo *Ucinula necator*), *Ustilago maydis* (por ejemplo tizón del maíz), *Venturia* spp. (por ejemplo *Venturia inaequalis* o *Venturia pirina*) o *Verticillium* spp. (por ejemplo *Verticillium dahliae* o *Verticillium albo-atrum*);

- 45 (2) una célula fúngica de, o una célula derivada de un hongo capaz de infestar a seres humanos, tales como, pero sin limitación, *Candida* spp., particularmente *Candida albicans*; Dermatófitos incluyendo *Epidermophyton* spp., *Trichophyton* spp., y *Microsporum* spp.; *Aspergillus* spp. (particularmente *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus terreus*); *Blastomyces dermatitidis*; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Coccidioides immitis*; *Cryptococcus neoformans*; *Histoplasma capsulatum* Var. *capsulatum* o Var. *Duboisii*; *Sporothrix schenckii*; *Fusarium* spp.; *Scopulariopsis brevicaulis*; *Fonsecaea* spp.; *Penicillium* spp.; o el grupo de hongos zigomicetos (particularmente *Absidia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus* o *Rhizopus arrizus*);

- 50 (3) una célula fúngica de, o una célula derivada de un hongo capaz de infestar a animales, tales como, pero sin limitación, *Candida* spp., *Microsporum* spp. (particularmente *Microsporum canis* o *Microsporum gypseum*), *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus* spp., o *Cryptococcus neoformans*;

y

- 55 (4) una célula fúngica de, o una célula derivada de un hongo que causa daños no deseados a sustratos o a materiales, tales como hongos que atacan a comestibles, semillas, madera, pintura, plástico, textiles, etc. Los ejemplos de dichos hongos son los mohos, incluyendo pero sin limitación, *Stachybotrys* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. o *Phanerochaete chrysosporium*.

II. Identificación de secuencias diana

La presente divulgación proporciona un método para identificar y obtener un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica para producir un ARNbc o un ARNpi. Por ejemplo, dicho método comprende: (a) sondear un ADNc o una biblioteca de ADN genómico con una sonda de hibridación que comprende la totalidad o una porción de una secuencia nucleotídica o un homólogo de la misma a partir de una plaga usada como diana; (b) identificar un clon de ADN que hibrida con la sonda de hibridación; (c) aislar el clon de ADN identificado en la etapa (b); y (d) secuenciar el ADNc o el fragmento de ADN genómico que comprende el clon aislado en la etapa (c) en el que la molécula de ácido nucleico secuenciada transcribe la totalidad o una porción sustancial de la secuencia del nucleótido de ARN o un homólogo del mismo.

Adicionalmente, la presente divulgación contempla un método para obtener un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica para producir una porción sustancial de un ARNbc o un ARNpi que comprende: (a) sintetizar el primer y el segundo cebador oligonucleotídico correspondiente a una porción de una de las secuencias nucleotídicas de una plaga usada como diana; y (b) amplificar un molde de ADNc o de ADN genómico en un vector de clonación usando el primer y el segundo cebador oligonucleotídico de la etapa (a) en el que la molécula de ácido nucleico amplificada transcribe una porción sustancial de un ARNbc o ARNpi.

En la puesta en práctica de la presente divulgación, un gen diana puede derivarse de cualquier plaga que cause daño a otro organismo. Pueden emplearse varios criterios para la selección de los genes diana preferidos. El gen es uno cuyo producto proteico tiene una rápida velocidad de renovación, de tal forma que la inhibición del ARNbc dará como resultado una rápida disminución de los niveles de proteína. En determinadas realizaciones, es ventajoso seleccionar un gen para el que una pequeña pérdida en el nivel de expresión da como resultado efectos perjudiciales para la plaga receptora. Si se desea usar como diana una amplia variedad de especies de insectos, por ejemplo, se selecciona un gen que esté elevadamente conservado entre estas especies. Por el contrario, con el fin de conferir especificidad, en determinadas realizaciones, se selecciona un gen que contiene regiones que están poco conservadas entre especies individuales de insectos, o entre insectos y otros organismos. En determinadas realizaciones, puede ser deseable seleccionar un gen que no tiene homólogos conocidos en otros organismos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "derivado de" se refiere a una secuencia nucleotídica específica que puede obtenerse a partir de una fuente o especie particular específica, aunque no necesariamente directamente de esa fuente o especie específica.

En una realización, se selecciona un gen que se expresa en el intestino del insecto. Los genes diana expresados en el intestino evitan la necesidad de que el ARNbc se extienda por el insecto. Los genes diana pueden incluir, por ejemplo, aquellos que comparten homología sustancial con las secuencias nucleotídicas de genes conocidos que se expresan en el intestino que codifican componentes proteicos de la V-ATPasa de protones de membrana plasmática (Dow et al., 1997, Dow, 1999). Este complejo de proteínas es la única fuente de energía del transporte de iones epitelial y es responsable de la alcalinización del lumen del intestino medio. La V-ATPasa también se expresa en el túbulo de Malpighi, un sobrecrecimiento de intestino posterior del insecto que funciona en equilibrio fluido y en la detoxificación de compuestos exógenos de un modo análogo a un órgano de riñón de un mamífero.

En otra realización, se selecciona un gen que está esencialmente implicado en el crecimiento, desarrollo y reproducción de un insecto. Los genes ejemplares incluyen, pero sin limitación, las subunidades estructurales de proteínas ribosomales y un gen de coatómero beta, el gen CHD3. Las proteínas ribosomales, tales como S4 (RpS4) y S9 (RpS9) son constituyentes estructurales del ribosoma implicados en la biosíntesis de proteínas y que son componentes de la subunidad pequeña ribosómica citosólica, las proteínas ribosómicas, tales como L9 y L19 son constituyentes estructurales del ribosoma implicados en la biosíntesis de proteínas que se localiza en el ribosoma. El gen de coatómero beta en *C. elegans* codifica una proteína que es una subunidad de un complejo multimérico que forma un revestimiento de vesícula de membrana. Se han descubierto secuencias similares en diversos organismos, tales como *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* y *Saccharomyces cerevisiae*. Se encuentran secuencias relacionadas en diversos organismos, tales como *Leptinotarsa decemlineata*, *Phaedon cochleariae*, *Epilachna varivertis*, *Anthonomus grandis*, *Tribolium castaneum*, *Myzus persicae*, *Nilaparvata lugens*, *Chilo suppressalis*, *Plutella xylostella* y *Acheta domesticus*. Otras dianas génicas pueden incluir, por ejemplo, aquellas que juegan papeles importantes en la viabilidad, crecimiento, desarrollo, reproducción e infectividad. Estos genes diana incluyen, por ejemplo, genes constitutivos, factores de transcripción y genes específicos de insecto o mutaciones *knockout* letales en *Caenorhabditis* o *Drosophila*. Los genes diana también pueden ser aquellos que son de otros organismos, por ejemplo, de un nematodo (por ejemplo, *Meloidogyne* spp. o *Heterodera* spp.), otros insectos o arácnidos (por ejemplo, *Leptinotarsa* spp., *Phaedon* spp., *Epilachna* spp., *Anthonomus* spp., *Tribolium* spp., *Myzus* spp., *Nilaparvata* spp., *Chilo* spp., *Plutella* spp., o *Acheta* spp. Además, la secuencia nucleotídica para su uso como secuencia diana también puede derivarse de genes virales, bacterianos, fúngicos, o de insecto cuyas funciones se han establecido a través de la bibliografía y cuyas secuencias de nucleótidos comparten una similitud sustancial con los genes diana en el genoma de un insecto.

Para muchos de los insectos que son dianas potenciales para su control, puede haber información limitada referente a las secuencias de la mayoría de genes o del fenotipo resultante de la mutación de genes particulares. Por tanto, pueden seleccionarse genes basándose en la información disponible referente a genes correspondientes en un organismo modelo, tal como *Caenorhabditis* o *Drosophila*, o en otras especies de insectos. También pueden seleccionarse genes basándose en la información de secuencias disponible para otras especies, tales como

especies de nematodos o fúngicas, en las que se han caracterizado los genes. En algunos casos será posible obtener la secuencia de un gen correspondiente a partir de un insecto diana efectuando búsquedas en bases de datos, tales como GenBank, usando bien el nombre del gen o la secuencia del gen. Una vez que se ha obtenido la secuencia, puede usarse la PCR para amplificar un segmento seleccionado de manera adecuada del gen en el insecto.

Para obtener un segmento de ADN a partir del gen correspondiente en una especie de insecto, por ejemplo, pueden diseñarse cebadores de PCR basándose en la secuencia tal como se encuentra en *C. elegans* o *Drosophila*, o un insecto a partir del cual ya se ha clonado el gen. Los cebadores se diseñan para amplificar un segmento de ADN de longitud suficiente. Las condiciones de amplificación se seleccionan de tal forma que sucederá la amplificación incluso si los cebadores no coinciden exactamente con la secuencia diana. Como alternativa, el gen, o una porción del mismo, puede clonarse a partir de una biblioteca de ADN genómico o de ADNc preparada a partir de la especie de plaga de insecto, usando un gen de insecto conocido como sonda. Se conocen técnicas para llevar a cabo la PCR y la clonación a partir de bibliotecas. En los ejemplos se proporcionan detalles adicionales del proceso mediante el cual los segmentos de ADN procedentes de especies de plagas de insecto diana pueden aislarse basándose en la secuencia de genes clonados anteriormente a partir de una especie de insecto. Un experto en la materia será consciente de que puede usarse una diversidad de técnicas para aislar segmentos génicos de especies de plagas de insectos que correspondan a genes previamente aislados de otras especies.

III. Métodos para inhibir o suprimir un gen diana

La presente divulgación proporciona métodos para inhibir la expresión génica de uno o múltiples genes diana en una plaga diana usando métodos de ARNbc estabilizado. La divulgación es particularmente útil para modular la expresión génica de eucariotas, en particular, modular la expresión de genes presentes en plagas que muestran un nivel de pH del sistema digestivo que es de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 9,5, más preferentemente de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0 y aún más preferentemente de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5. Para plagas con un sistema digestivo que muestra niveles de pH fuera de estos intervalos, pueden desearse el uso de métodos de administración que no requieran la ingestión de moléculas de ARNbc.

Los métodos abarcan proporcionar simultánea o secuencialmente dos o más construcciones de ARN bicatenario o de ARN al mismo insecto, para lograr la regulación negativa o la inhibición de múltiples genes diana o para lograr una inhibición más potente de un solo gen diana.

Como alternativa, se usan múltiples dianas proporcionando un ARN bicatenario que se dirige a múltiples secuencias diana y una sola diana se inhibe de manera más eficaz por la presencia de más de una copia del fragmento de ARN bicatenario correspondiente al gen diana. Por lo tanto, en una realización, la construcción de ARN bicatenario comprende múltiples regiones de ARNbc, comprendiendo al menos una hebra de cada región de ARNbc una secuencia nucleotídica que es complementaria a al menos parte de una secuencia nucleotídica diana de un gen diana de insecto. Las regiones de ARNbc en la construcción de ARN pueden ser complementarias al mismo o a diferentes genes diana y/o las regiones de ARNbc pueden ser complementarias a dianas de la misma o diferentes especies de insectos. El uso de dichas construcciones de ARNbc en una célula vegetal hospedadora, por lo tanto, confiere una resistencia más potente a una sola o a múltiples especies de insectos en la planta. En una realización, la región de ARN bicatenario comprende múltiples copias de la secuencia nucleotídica que es complementaria al gen diana. Como alternativa, el ARNbc se dirige a más de una secuencia diana del mismo gen diana. La divulgación por lo tanto abarca construcciones de ARN bicatenario aislado que comprenden al menos dos copias de dicha secuencia de nucleótidos complementarias a al menos parte de una secuencia nucleotídica de una diana de insecto. Puede desarrollarse ARNbc que se dirige a más de una de las dianas anteriormente mencionadas, o una combinación de diferentes ARNbc contra dianas diferentes anteriormente mencionadas. Los nucleótidos de ARNbc y construcciones de ARNbc adecuadas se describen en el documento WO2006/046148.

Los términos "dirigir", "se dirige" y "dirección" son expresiones alternativas para indicar que al menos una de las hebras del ARNbc es complementaria a y como tal puede unirse a, el gen o secuencia nucleotídica diana.

El efecto modulador del ARNbc es aplicable a una diversidad de genes expresados en las plagas, incluyendo, por ejemplo, genes endógenos responsables del metabolismo celular o de la transformación celular, incluyendo genes constitutivos, factores de transcripción y otros genes que codifican polipéptidos implicados en el metabolismo celular.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "inhibición de la expresión génica" o "inhibir la expresión de una diana génica en la célula de una plaga" se refiere a la ausencia (o disminución observable) en el nivel de producto de proteína y/o ARNm del gen diana. La especificidad se refiere a la capacidad para inhibir el gen diana sin efectos manifiestos sobre otros genes de la célula y sin efectos sobre cualquier gen en la célula que esté produciendo la molécula de ARNbc. La inhibición de la expresión génica del gen diana en la plaga puede dar como resultado nuevos rasgos fenotípicos en la plaga.

"Supresión génica" se refiere a cualquiera de los métodos bien conocidos para reducir los niveles de transcripción génica a ARNm y/o la posterior traducción del ARNm. La supresión génica también pretende indicar la reducción de

la expresión de proteínas a partir de un gen o una secuencia codificante, incluyendo la supresión génica postranscripcional y la supresión transcripcional. La supresión génica postranscripcional está mediada por la homología entre la totalidad o una parte de un ARNm transcrito a partir de un gen o secuencia génica usada como diana para su supresión y el ARN bicatenario correspondiente usado para la supresión y se refiere a la reducción sustancial y medible de la cantidad de ARNm disponible en la célula para unirse a los ribosomas. El ARN transcrito puede estar en orientación con sentido para efectuar lo que se denomina co-supresión, en la orientación antisentido para efectuar lo que se denomina supresión antisentido, o en ambas orientaciones, produciendo un ARNbc lo que se denomina interferencia de ARN (ARNi).

La supresión transcripcional está mediada por la presencia en la célula de un agente de supresión génica de ARNbc que muestra una identidad de secuencia sustancial con una secuencia de ADN promotora o con el complemento de la misma para efectuar lo que se denomina una *trans* supresión de promotor. La supresión génica puede ser eficaz contra un gen hospedador nativo asociado a un rasgo, por ejemplo, para proporcionar hospedadores con niveles reducidos de una proteína codificada por el gen nativo o con niveles potenciados o reducidos de un metabolito afectado. La supresión génica también puede ser eficaz contra genes diana en plagas que pueden ingerir o estar en contacto con material que contiene agentes de supresión génica, específicamente diseñados para inhibir o suprimir la expresión de una o más secuencias homólogas o complementarias en la célula de la plaga.

Un método beneficioso para la supresión génica postranscripcional en hospedadores emplea ARN transcrito tanto en orientación con sentido como con orientación antisentido que está estabilizado, por ejemplo, como una estructura en horquilla y de tallo y bucle. Una construcción de ADN preferida para efectuar la supresión génica postranscripcional es una en la que un primer segmento codifica un ARN que muestra una orientación antisentido que muestra una identidad sustancial con un segmento de un gen usado como diana para supresión, que está unido a un segundo segmento en orientación con sentido que codifica un ARN que muestra una complementariedad sustancial con el primer segmento. Dicha construcción forma una estructura de tallo y bucle mediante la hibridación del primer segmento con el segundo segmento y se forma una estructura de tallo y bucle a partir de las secuencias nucleotídicas que unen a los dos segmentos (véanse los documentos WO94/01550, WO98/05770, US 2002/0048814 y US 2003/0018993).

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, se proporciona una secuencia nucleotídica para la que la expresión *in vitro* da como resultado la transcripción de una secuencia de ARN estabilizado que es sustancialmente homóloga a una molécula de ARN de un gen diana en una plaga que comprende una secuencia de ARN codificada por una secuencia nucleotídica del genoma de la plaga. Por tanto, después de que la plaga capte la secuencia de ARN estabilizada, o de otra manera, se exponga al ARNbc, se efectúa una regulación negativa de la secuencia de nucleótidos correspondiente al gen diana en las células de una plaga diana.

La inhibición de un gen diana usando la tecnología de ARNbc estabilizado es específica de secuencia en tanto que las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región dúplex del ARN son dianas para inhibición genética. Se prefiere ARN que contiene secuencias nucleotídicas idénticas a una porción del gen diana. Se ha descubierto que las secuencias de ARN con inserciones, eliminaciones y mutaciones puntuales en relación a la secuencia diana también son efectivas para la inhibición. Se prefiere que el ARNbc inhibidor y la porción del gen diana compartan al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia, o aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia, o aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia, o aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia, o incluso aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia. Como alternativa, la región dúplex del ARN puede definirse funcionalmente como una secuencia nucleotídica que es capaz de hibridar con una porción del transcrito del gen diana. Una secuencia menor de la de longitud completa que muestra una homología mayor compensa a una secuencia menos homóloga más larga. La longitud de las secuencias nucleotídicas idénticas puede ser de al menos aproximadamente 25 50, 100, 200, 300, 400, 500 o al menos aproximadamente 1000 bases. Normalmente, debe usarse una secuencia de más de 20-100 nucleótidos, aunque se preferiría una secuencia de más de aproximadamente 200-300 nucleótidos y se preferiría especialmente una secuencia de más de aproximadamente 500-1000 nucleótidos dependiendo del tamaño del gen diana. Esto tiene la ventaja de ser capaz de tolerar variaciones de secuencia que podrían esperarse debido a mutación genética, polimorfismo de cepa o divergencia evolutiva. La molécula de ácido nucleico introducida puede no necesitar ser absolutamente homóloga, puede no necesitar ser de longitud completa en relación bien al producto primario de transcripción o al ARNm totalmente procesado del gen diana. Por tanto, los expertos en la materia tienen que darse cuenta de que, tal como se divulgan en el presente documento, no es necesaria una identidad de secuencia del 100 % entre el ARN y el gen diana para poner en práctica los métodos divulgados en el presente documento.

IV. Métodos para preparar ARNbc

Las moléculas de ARNbc pueden sintetizarse *in vivo* o *in vitro*. El ARNbc puede formarse mediante una sola hebra de ARN autocomplementaria o a partir de dos hebras de ARN complementarias. La ARN polimerasa endógena de la célula puede mediar la transcripción *in vivo*, o puede usarse ARN polimerasa clonada para la transcripción *in vivo* o *in vitro*. La inhibición puede estar dirigida mediante transcripción específica en un órgano, tejido, o tipo celular; la estimulación de una condición ambiental (por ejemplo, infección, estrés, temperatura, inductores químicos); y/o diseñar la transcripción a un estadio del desarrollo o edad. Las hebras de ARN pueden estar o no poliadeniladas; las hebras de ARN pueden ser o no capaces de traducirse en un polipéptidos por el aparato transcripcional de una

célula.

Un ARN, ARNbc, ARNpi, o ARNmi puede producirse química o enzimáticamente por un experto en la materia mediante reacciones manuales o automatizadas o *in vivo* en otro organismo. El ARN también puede producirse mediante síntesis orgánica parcial o total; puede introducirse cualquier ribonucleótido modificado mediante síntesis enzimática u orgánica *in vitro*. El ARN puede sintetizarse por una ARN polimerasa celular o por una ARN polimerasa de bacteriófago (por ejemplo, T3, T7, SP6). El uso y la producción de una construcción de expresión se conocen en la materia (véase, por ejemplo, el documento WO 97/32016; Las Patentes de Estados Unidos N° 5.593.874, 5.698.425, 5.712.135, 5.789.214 y 5.804.693). Si se sintetiza químicamente o mediante síntesis enzimática *in vitro*, el ARN puede purificarse antes de la introducción en la célula. Por ejemplo, el ARN puede purificarse a partir de una mezcla mediante extracción con un disolvente o una resina, precipitación, electroforesis, cromatografía, o una de sus combinaciones. Como alternativa, el ARN puede usarse sin o con una purificación mínima para evitar pérdidas debido al procesamiento de la muestra. EL ARN puede secarse para su almacenamiento o disolverse en una solución acuosa. La solución puede contener tampones o sales para promover la hibridación y/o estabilización de las hebras dúplex.

15 V. Secuencias polinucleotídicas

De acuerdo con la divulgación se proporcionan secuencias nucleotídicas, cuya expresión da como resultado una secuencia de ARN que es sustancialmente homóloga a una molécula de ARN de un gen diana en una plaga que comprende una secuencia de ARN codificada por una secuencia nucleotídica en el genoma de la plaga. Por lo tanto, tras la ingestión de la secuencia de ARNbc puede obtenerse la regulación negativa de la secuencia nucleotídica del gen diana en las células de la plaga dando como resultado un efecto perjudicial sobre el mantenimiento, viabilidad, proliferación, reproducción e infestación de la plaga.

Cada "secuencia nucleotídica" expuesta en el presente documento se presenta como una secuencia de desoxirribonucleótidos (abreviados como A, G, C y T). Sin embargo, se entiende por "secuencia nucleotídica" de una molécula de ácido nucleico o polinucleótido, para una molécula o polinucleótido de ADN, una secuencia de desoxirribonucleótidos y para una molécula o polinucleótido de ARN, la secuencia correspondiente de ribonucleótidos (A, G, C y U) donde cada desoxinucleótido de timina (T) en la secuencia de desoxinucleótido especificada se reemplaza por el ribonucleótido uracilo (U).

Tal como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico" se refiere a un polímero de bases de desoxirribonucleótido o ribonucleótido monocatenario o bicatenario leído del extremo 5' al extremo 3'. Un ácido nucleico puede contener opcionalmente bases nucleotídicas de origen no natural o alteradas que permiten la lectura correcta por una polimerasa y que no reducen la expresión de un polipéptido codificado por ese ácido nucleico. Una "secuencia nucleotídica" o "secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a las hebras tanto con sentido como antisentido de un ácido nucleico bien como hebras individuales o en el dúplex.

El término "ácido ribonucleico" (ARN) es inclusivo de ARNi (ARN inhibidor), ARNbc (ARN bicatenario), ARNpi (ARN pequeño interferente), ARNm (ARN mensajero), ARNmi (micro ARN), ARNt (ARN transferente, ya esté cargado o descargado con un aminoácido acilado correspondiente) y ARNc (ARN complementario) y el término "ácido desoxirribonucleico" (ADN) es inclusivo de ADNc y ADN genómico y de híbridos de ADN-ARN.

Las expresiones "segmento de ácido nucleico", "segmento de secuencia de nucleótidos", o más generalmente "segmento" se entenderá por los expertos en la materia como una expresión funcional que incluye tanto secuencias genómicas, secuencias de ARN ribosómico, secuencias de ARN transferente, secuencias de ARN mensajero, secuencias de operón y secuencias nucleotídicas diseñadas más pequeñas que expresan o pueden adaptarse para expresar proteínas, polipéptidos o péptidos.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en cualquiera de las secuencias polinucleotídicas de las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677. La divulgación también proporciona fragmentos de las secuencias polinucleotídicas de las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677. La divulgación proporciona además ácidos nucleicos complementarios, o fragmentos de los mismos, para cualquiera de las secuencias polinucleotídicas de las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677, así como un ácido nucleico que comprende al menos 15 bases contiguas que hibrida con cualquiera de las secuencias polinucleotídicas de las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677.

La presente divulgación también proporciona secuencias ortólogas y complementos y fragmentos de las mismas, de las secuencias polinucleotídicas de las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677. Por consiguiente, la divulgación abarca secuencias diana que son ortólogos de insecto de un gen que comprende una secuencia nucleotídica tal como se representa en cualquiera de las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677. A modo de ejemplo, los ortólogos de insecto pueden comprender una secuencia nucleotídica tal como se representa en

cualquiera de las SEC ID N°: 122-123, 1010 y 1437 o un fragmento de las mismas de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 o 27 nucleótidos. En la **Tabla 4** se proporciona una lista no limitante de genes ortólogos de insectos o arácnidos o secuencias que comprenden al menos un fragmento de 15, preferentemente de al menos 17 pb de una de las secuencias de la divulgación.

5 La divulgación también abarca secuencias diana que son ortólogos de nematodo de un gen que comprende una secuencia nucleotídica tal como se representa en cualquiera de las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677. A modo de ejemplo, los ortólogos de nematodos pueden comprender una secuencia nucleotídica tal como se representa en cualquiera de las SEC ID N°: 1023-1025, o un fragmento de las mismas de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 nucleótidos. De acuerdo con otro aspecto, la
10 divulgación abarca por lo tanto cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para controlar el crecimiento de nematodos en un organismo, o para prevenir la infestación por nematodos de un organismo susceptible a la infección por nematodos, que comprende poner en contacto células de nematodo con un ARN bicatenario, en el que dicho ARN bicatenario comprende hebras complementarias hibridadas, una de las cuales tiene una secuencia nucleotídica que es complementaria a al menos parte de la secuencia nucleotídica de un gen
15 diana que comprende un fragmento de al menos 21 nucleótidos de cualquiera de las secuencias tal como se representan en las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677, en el que el ARN bicatenario se capta por el nematodo y por lo tanto controla el crecimiento o evita la infestación. La divulgación también se refiere a plantas transgénicas resistentes a nematodos que comprenden un fragmento de al menos 21 nucleótidos de cualquiera de las secuencias tal como se representan en las SEC ID N°:
20 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677. En la Tabla 5 se proporciona una lista no limitante de genes ortólogos de nematodos o secuencias que comprenden al menos un fragmento de 15, preferentemente de al menos 17 pb de una de las secuencias de la divulgación.

De acuerdo con otra realización, la divulgación abarca secuencias diana que son ortólogos fúngicos de un gen que comprende una secuencia nucleotídica tal como se representa en cualquiera de las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157,
25 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677. A modo de ejemplo, los ortólogos fúngicos pueden comprender una secuencia nucleotídica tal como se representa en cualquiera de las SEC ID N°: 157, 158 y 1040 o un fragmento de al menos 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 o 27 nucleótidos de las mismas. De acuerdo con otro aspecto, la divulgación abarca por lo tanto cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para controlar el crecimiento fúngico en una célula o en un organismo, o para prevenir la infestación
30 fúngica de una célula o un organismo susceptible a la infección fúngica, que comprende poner en contacto células fúngicas con una ARN bicatenario, en el que dicho ARN bicatenario comprende hebras complementarias hibridadas, una de las cuales tiene una secuencia nucleotídica que es complementaria a al menos parte de la secuencia nucleotídica de un gen diana que comprende un fragmento de al menos 21 nucleótidos de cualquiera de las secuencias tal como se representan en las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a
35 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677, en el que el ARN bicatenario se capta por el hongo y por lo tanto controla el crecimiento o evita la infestación. La divulgación también se refiere a plantas transgénicas resistentes a hongos que comprenden un fragmento de al menos 17, 18, 19, 20 o 21 de cualquiera de las secuencias representadas en las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677. En la Tabla 6 se proporciona una lista no limitante de genes ortólogos fúngicos o secuencias que comprenden al menos
40 un fragmento de 15, preferentemente de al menos 17 pb de una de las secuencias de la divulgación.

En una realización adicional, una molécula de ARNbc de la divulgación comprende cualquiera de las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677, aunque las secuencias expuestas en las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113,
45 1437 y 1677 no son limitantes. Una molécula de ARNbc puede comprender cualquier gen diana contiguo procedente de una especie de plaga (por ejemplo, de aproximadamente 25 o más, o de aproximadamente 21, 22, 23, 24, o 25 o más nucleótidos contiguos).

Por molécula(s) de ácido nucleico "aislada(s)" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha extraído de su ambiente natural. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en una construcción de ADN se consideran aisladas para los fines de la presente divulgación. Los ejemplos adicionales de moléculas de
50 ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células hospedadoras heterólogas o moléculas de ADN purificadas (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vitro* de las moléculas de ADN de la presente divulgación. Las moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente.

Las moléculas de ácido nucleico pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm, o en forma de ADN, incluyendo, por ejemplo, ADNc y ADN genómico obtenido mediante clonación o producido sintéticamente. EL ADN o ARN puede ser bicatenario o monocatenario. El ADN monocatenario puede ser la hebra codificante, también conocido como la hebra con sentido, o puede ser la hebra no codificante, también citado como la hebra antisentido.

VI. Análisis de secuencias

A menos que se indique lo contrario, todas las secuencias nucleotídicas determinadas secuenciando una molécula de ADN se determinaron usando un secuenciador de ADN automatizado (tal como el Modelo 373 de Applied
60

Biosystems, Inc.). Por tanto, tal como se conoce en la materia para cualquier secuencia de ADN determinada mediante esta estrategia automatizada, cualquier secuencia nucleotídica determinada en el presente documento puede contener algunos errores. Las secuencias nucleotídicas determinadas mediante automatización son típicamente al menos aproximadamente un 95 % idénticas, más típicamente al menos aproximadamente un 96 % hasta al menos aproximadamente un 99,9 % idénticas a la secuencia nucleotídica real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real puede determinarse de manera más precisa mediante otras estrategias, incluyendo métodos de secuenciación manual de ADN bien conocidos en la técnica. Como también se sabe en la técnica, una sola inserción o deleción en una secuencia de nucleótidos determinada, comparada con la secuencia real, provocará un desplazamiento del marco en la traducción de la secuencia nucleotídica, de tal forma que la secuencia de aminoácidos predicha codificada por una secuencia nucleotídica determinada puede ser completamente diferente de la secuencia de aminoácidos realmente codificada por la molécula de ADN secuenciada, comenzando en el punto de dicha inserción o deleción.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas de hibridación con una porción del polinucleótido en una molécula de ácido nucleico descrita anteriormente. Por un polinucleótido que hibrida con una "porción" de un polinucleótido se entiende un polinucleótido (bien de ADN o de ARN) que hibrida con al menos aproximadamente 15 nucleótidos y más preferentemente con al menos aproximadamente 20 nucleótidos y aún más preferentemente con al menos aproximadamente 30 nucleótidos, e incluso más preferentemente con más de 30 nucleótidos del polinucleótido de referencia. Estos fragmentos que hibridan con los fragmentos de referencia son útiles como sondas y cebadores diagnósticos. Dos secuencias hibridan cuando forman un complejo bicatenario en una solución de hibridación de SSC 6X, SDS al 0,5 %, solución de Denhardt 5X y 100 µg de ADN portador no específico. Véase Ausubel et al., sección 2.9, suplemento 27 (1994). Las secuencias pueden hibridar a "rigurosidad moderada", que se define como una temperatura de 60 °C en una solución de hibridación de SSC 6X, SDS al 0,5 %, solución de Denhardt 5X y 100 µg de ADN portador no específico. Para la hibridación de "alta rigurosidad", la temperatura se aumenta a 68 °C. Después de la reacción de hibridación a rigurosidad moderada, se lavan los nucleótidos en una solución de SSC 2X más SDS al 0,05 % cinco veces a temperatura ambiente, con lavados posteriores con SSC 0,1X más SDS al 0,1 % a 60 °C durante 1 h. Para alta rigurosidad, la temperatura de lavado se aumenta a 68 °C. Los nucleótidos hibridados son aquellos que se detectan usando 1 ng de una sonda radiomarcada que tiene una radiactividad específica de 10.000 cpm/ng, donde los nucleótidos hibridados son claramente visibles después de exposición a película de rayos X a -70 °C durante no más de 72 horas.

La presente solicitud se dirige a dichas moléculas de ácido nucleico que son al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a una secuencia de ácido nucleico descrita en cualquiera de las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677. Sin embargo, se prefieren moléculas de ácido nucleico que son al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a la secuencia de ácido nucleico expuesta en cualquiera de las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677. Las diferencias entre dos secuencias de ácido nucleico pueden suceder en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia nucleotídica de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Como aspecto particular, si cualquier molécula de ácido nucleico particular es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia nucleotídica de referencia se refiere a una comparación efectuada entre dos moléculas usando algoritmos bien conocidos en la técnica y puede determinarse convencionalmente usando programas informáticos disponibles públicamente, tales como el algoritmo BLASTN. Véase Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997).

En una realización, un ácido nucleico comprende una hebra antisentido que tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30), en el que la hebra antisentido es complementaria a una secuencia de ARN o una porción de la misma que codifica una proteína que controla el ciclo celular o la recombinación de homólogos y en el que dicho ANpi comprende además una hebra sentido que tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30) y en el que dicha hebra con sentido y dicha hebra antisentido son secuencias nucleotídicas distintas donde al menos aproximadamente 15 nucleótidos en cada hebra son complementarios con la otra hebra.

En una realización, la presente divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico bicatenarias que median dicho silenciamiento génico de interferencia de ARN. En otra realización, las moléculas de ANpi consisten en moléculas de ácido nucleico dúplex que contienen de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 pares de bases entre oligonucleótidos que comprenden de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30). En otra realización más, las moléculas de ANpi comprenden moléculas de ácido nucleico dúplex con extremos salientes de aproximadamente 1 a aproximadamente 32 nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, o 3), por ejemplo, dúplex de aproximadamente 21 nucleótidos con aproximadamente 19 pares de bases y salientes 3'-terminales de mononucleótido, dinucleótido o trinucleótido. En otra realización más, las moléculas de ANpi comprenden moléculas de ácido nucleico dúplex con extremos romos, donde ambos extremos son romos, o como alternativa, donde uno de

los extremos es romo.

Una molécula de ANpi puede comprender nucleótidos modificados a la vez que se mantiene la capacidad para mediar la ARNi. Los nucleótidos modificados pueden usarse para mejorar características *in vitro* o *in vivo* tales como la estabilidad, actividad, y/o biodisponibilidad. Por ejemplo, una molécula de ANpi puede comprender nucleótidos modificados como un porcentaje del número total de nucleótidos presentes en la molécula de ANpi. Como tal, una molécula de ANpi puede comprender generalmente de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 100 % de nucleótidos modificados (por ejemplo, aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de nucleótidos modificados). El porcentaje real de nucleótidos modificados presentes en una molécula de ANpi dada dependerá del número total de nucleótidos presentes en el ANpi. Si la molécula de ANpi es monocatenaria, el porcentaje de modificación puede basarse en el número total de nucleótidos presentes en las moléculas de ANpi monocatenarias. Del mismo modo, si la molécula de ANpi es bicatenaria, el porcentaje de modificación puede basarse en el número total de nucleótidos presentes en la hebra con sentido, en la hebra antisentido, o en las hebras tanto con sentido como antisentido.

VII. Construcciones de ácido nucleico

Un vector de ácido nucleico recombinante puede, por ejemplo, ser un plásmido lineal o circular cerrado. El sistema de vector puede ser un solo vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ácido nucleico total que se va a introducir en el genoma del hospedador bacteriano. Además, un vector bacteriano puede ser un vector de expresión. Las moléculas de ácido nucleico tal como se exponen en las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677 o fragmentos de las mismas pueden, por ejemplo, insertarse sustancialmente en un vector bajo el control de un promotor adecuado que funciona en uno o más hospedadores microbianos para dirigir la expresión de una secuencia codificante enlazada u otra secuencia de ADN. Hay muchos vectores disponibles para este fin y la selección del vector adecuado dependerá principalmente del tamaño del ácido nucleico que se va a insertar en el vector y de la célula hospedadora particular que se va a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes dependiendo de su función (amplificación de ADN o expresión de ADN) y de la célula hospedadora particular con la que sea compatible. Los componentes de vector para transformación bacteriana incluyen generalmente, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes de marcador de selección y un promotor inducible que permite la expresión de ADN exógeno.

Promotores

"Unido operativamente", tal como se usa en referencia a una secuencia reguladora y a una secuencia nucleotídica estructural, significa que la secuencia reguladora provoca la expresión regulada de la secuencia nucleotídica estructural enlazada. Las "secuencias reguladoras" o los "elementos de control" se refieren a secuencias nucleotídicas situadas cadena arriba (secuencias no codificantes 5'), en, o cadena abajo (secuencias 3' no traducidas) de una secuencia nucleotídica estructural y que influencia la sincronía y el nivel o cantidad de transcripción, procesamiento de ARN o estabilidad, o la traducción de la secuencia nucleotídica estructural asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, intrones, potenciadores, estructuras de tallo-bucle, secuencias de unión represoras y secuencias de reconocimiento de poliadenilación y similares.

Un vector de expresión para producir un ARNm también puede contener un promotor inducible que se reconoce por el organismo bacteriano hospedador y está unido operativamente al ácido nucleico que codifica, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico que codifica el ARNm de *D. v. virgífera* o un fragmento de interés del mismo. Los promotores inducibles adecuados para su uso con hospedadores bacterianos incluyen el promotor de β -lactamasa, promotores PL y PR de fago λ de *E. coli* y promotor de galactosa de *E. coli*, promotor de arabinosa, promotor de fosfatasa alcalina, promotor de triptófano (*trp*) y el promotor del operón de lactosa y variaciones de los mismos y promotores híbridos, tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos inducibles conocidos.

En determinadas realizaciones, los genes pueden proceder de diferentes insectos para ampliar la variedad de insectos contra la que el agente es efectivo. Cuando genes múltiples se dirigen a la supresión o a una combinación de expresión y supresión, puede fabricarse un elemento de ADN policistrónico como se ilustra y se desvela en la solicitud de publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004-0029283 de Fillati.

Genes de marcador de selección

Un vector o construcción de ADN recombinante comprenderá típicamente un marcador de selección que confiera un fenotipo de selección en células transformadas. Los marcadores de selección también pueden usarse para seleccionar células que contienen los ácidos nucleicos exógenos que codifican polipéptidos o proteínas. El marcador puede codificar resistencia a un biocida, tal como la resistencia a antibióticos (por ejemplo, kanamicina, bleomicina G418, higromicina, etc.). Los ejemplos de marcadores de selección incluyen, pero sin limitación, un gen *neo* que codifica resistencia a kanamicina y puede seleccionarse para usar kanamicina, G418, etc., un gen *bar* que codifica resistencia a bialafós; un gen de nitrilasa que confiere resistencia a bromoxinilo; y un gen DHFR de resistencia a

metotrexato. Los ejemplos de dichos marcadores de selección se ilustran en las Patentes de Estados Unidos 5.550.318; 5.633.435; 5.780.708 y 6.118.047.

Un vector o construcción recombinante puede incluir también un marcador de exploración. Los marcadores de exploración pueden usarse para controlar la expresión. Los ejemplos de marcadores de exploración incluyen un gen de β -glucuronidasa o de uidA (GUS) que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos (Jefferson, 1987; Jefferson *et al.*, 1987); un gen de β -lactamasa (Sutcliffe *et al.*, 1978), un gen que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen de luciferasa (Ow *et al.*, 1986) un gen de xylE (Zukowsky *et al.*, 1983) que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir catecoles cromogénicos; un gen de α -amilasa (Ikatu *et al.*, 1990); un gen de tirosinasa (Katz *et al.*, 1983) que codifica una enzima capaz de oxidar tirosina a DOPA y dopaquinona que a su vez se condensa en melanina; una α -galactosidasa, que cataliza a un sustrato cromogénico de α -galactosa.

Puede prepararse un vector de transformación usando métodos disponibles en la técnica. El vector de transformación comprende una o más secuencias de nucleótidos que es/son capaces de transcribirse a una molécula de ARN y que es/son sustancialmente homólogos y/o complementarios a una o más secuencias de nucleótidos codificadas por el genoma del insecto, de tal forma que tras la captación del ARN existe regulación negativa de la expresión de al menos una de las secuencias de nucleótidos respectivas del genoma de la plaga.

VIII. Métodos para ingeniería genética

La presente divulgación contempla la introducción de una secuencia nucleotídica en un organismo para lograr niveles de expresión inhibidores de una plaga de una o más moléculas de ARNbc. Los polinucleótidos y polipéptidos pueden introducirse en una célula hospedadora, tal como una célula bacteriana o levadura, mediante procedimientos convencionales conocidos en la técnica para introducir secuencias recombinantes en una célula hospedadora diana. Dichos procedimientos incluyen, pero sin limitación, protocolos de transfección, infección, transformación captación natural, fosfato de calcio, electroporación, microinyección, biolística y transformación mediada por microorganismos. Los métodos seleccionados varían en función del organismo hospedador.

Un organismo transgénico es uno que comprende al menos una célula en su genoma en el que un ácido nucleico exógeno se ha integrado de manera estable. Por lo tanto, un organismo transgénico puede solo contener células modificadas genéticamente en determinadas partes de su estructura.

Por consiguiente, la presente divulgación también incluye una célula transgénica u organismo transgénico que comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos a construcciones de ADN recombinante descritas en el presente documento. La divulgación incluye adicionalmente células procariontas (tales como, pero sin limitación, células de bacterias gram positivas y gram negativas) y células eucariotas (tales como, pero sin limitación, células de levaduras o células vegetales).

Por ejemplo, la presente divulgación contempla la introducción de un gen diana en una bacteria tal como *Lactobacillus*. Las construcciones de ácido nucleico pueden integrarse en un genoma bacteriano con un vector de integración. Los vectores de integración típicamente contienen al menos una secuencia homóloga a la del cromosoma bacteriano que permite que el vector se integre. La integración parece ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma bacteriano. Por ejemplo, los vectores de integración construidos con ADN de diversas cepas de *Bacillus* se integran en el cromosoma de *Bacillus* (EP 0 127,328). Los vectores de integración también pueden comprender secuencias de bacteriófagos o de transposones. En la técnica también se conocen vectores suicidas.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes anteriormente indicados emplean técnicas convencionales de ADN recombinante. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se escinden, se diseñan y vuelven a ligarse en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos. Los ejemplos de vectores de expresión bacterianos disponibles incluyen, pero sin limitación, los vectores de clonación y expresión multifuncionales de *E. coli* tales como Bluescript™ (Stratagene, La Jolla, CA), en el que, por ejemplo, una proteína *D. v. virgífera* o fragmento de la misma, puede ligarse en fase en el vector con secuencias para la Met amino terminal y los 7 restos posteriores de la β -galactosidasa, de tal manera que se produce una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke y Schuster, 1989); y similares.

La divulgación también contempla la introducción de un gen diana en la célula de levadura. Una construcción recombinante de levadura puede incluir típicamente uno o más de los siguientes elementos: una secuencia promotora, una secuencia compañera de fusión, una secuencia líder, una secuencia de terminación de la transcripción, un marcador de selección. Estos elementos pueden combinarse en un casete de expresión, que pueden mantenerse en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaz de un mantenimiento estable en un hospedador, tal como una levadura o una bacteria. El replicón puede tener dos sistemas de replicación, permitiendo por tanto que se mantenga, por ejemplo, en la levadura para su expresión y en un hospedador procarionta para la clonación y amplificación. Los ejemplos de dichos vectores lanzadera de levadura-bacteria incluyen YEp24 (Botstein *et al.*, 1979), pCl/1 (Brake *et al.*, 1984), e YRp17 (Stinchcomb *et al.*, 1982).

Además, un replicón puede ser un plásmido con un alto o bajo número de copias. Un plásmido con un alto número de copias generalmente tendrá un número de copias que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 y típicamente de aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un hospedador que contiene un plásmido con un alto número de copias tendrá preferentemente al menos aproximadamente 10, y más preferentemente al menos aproximadamente 20.

Las secuencias promotoras útiles de levadura pueden proceder de genes que codifican enzimas en la ruta metabólica. Los ejemplos de dichos genes incluyen el gen del alcohol deshidrogenasa (ADH) (documento EP 0 284044), enolasa, glucoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAP o GAPDH), hexoquinasa, fosfofructoquinasa, 3-fosfoglicerato mutasa, y piruvato quinasa (PyK) (documento EP 0 3215447). El gen de PHO5 de levadura, que codifica la fosfatasa ácida, también proporciona secuencias promotoras útiles (Myanohara *et al.*, 1983). Además, promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también actúan como promotores de levadura. Los ejemplos de dichos promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora de ADH ligada a la región de activación de la transcripción de GAP (patentes de Estados Unidos N.º. 4.876.197 y 4.880.734). Los expertos en la técnica conocen ejemplos de secuencias terminadoras de la transcripción y otras secuencias terminadoras reconocidas en levaduras, tales como las que codifican enzimas glucolíticas.

Como alternativa, las construcciones de expresión pueden integrarse en el genoma de levadura con un vector de integración. Los vectores de integración típicamente contienen al menos una secuencia homóloga a la de un cromosoma de levadura que permite que el vector se integre y preferentemente contienen dos secuencias homólogas que flanquean la construcción de expresión. Las integraciones parecen ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma de la levadura (Orr-Weaver *et al.*, 1983). Un vector de integración puede dirigirse a un locus específico en levadura seleccionando la secuencia homóloga apropiada para la inclusión del vector. Véase Orr-Weaver *et al.*, citado anteriormente. Una o más construcciones de expresión pueden integrarse, posiblemente afectando a niveles de la proteína recombinante producida (Rine *et al.*, 1983).

IX. Cuantificación de la inhibición de expresión de gen diana

La inhibición de la expresión de un gen diana puede cuantificarse midiendo bien el ARN diana endógeno o la proteína producida mediante la traducción del ARN diana y las consecuencias de la inhibición pueden confirmarse mediante el examen de las propiedades evidentes de la célula u organismo. Las técnicas para cuantificar ARN y proteínas son conocidas para un experto habitual en la materia. Existen múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina, espectinicina, rifampicina y tetraciclina y similares.

En determinadas realizaciones, la expresión génica se inhibe en al menos un 10 %, preferentemente en al menos un 33 %, más preferentemente en al menos un 50 % y aún más preferentemente en al menos un 80 %. La expresión génica puede inhibirse en al menos un 80 %, más preferentemente en al menos un 90 %, más preferentemente en al menos un 95 %, o en al menos un 99 % en las células de la plaga de tal forma que tiene lugar una inhibición significativa. Una inhibición significativa pretende hacer referencia a una inhibición suficiente que da como resultado un fenotipo detectable (por ejemplo, cese del crecimiento larvario, parálisis o mortalidad, etc.) o una disminución detectable en el ARN y/o proteína correspondiente al gen diana que se está inhibiendo. Aunque en determinadas realizaciones la inhibición sucede en sustancialmente todas las células de la plaga, en otras realizaciones preferidas la inhibición ocurre solo en un subconjunto de células que expresan el gen. Por ejemplo, si el gen diana juega un papel esencial en las células en un tracto alimentario del insecto, la inhibición del gen en estas células es suficiente para ejercer un efecto perjudicial en el insecto.

X. Exposición de plagas al ARNbc

Una plaga puede exponerse a un ARNbc de cualquier manera adecuada que permita la administración del ARNbc a la plaga. Por ejemplo, la plaga puede ponerse en contacto con el ARNbc en forma pura o sustancialmente pura, por ejemplo, una solución acuosa que contenga el ARNbc. En una realización, el insecto se puede "impregnar" o "pulverizar" simplemente con una solución acuosa que comprenda el ARNbc. Como alternativa, la plaga se puede "pulverizar" con una solución que comprenda un ARNbc.

Como alternativa, el ARNbc puede ligarse a un componente alimentario de la plaga, tal como un componente alimentario para una plaga patógena de mamíferos, para aumentar la captación del ARNbc por el insecto. La ingestión por parte del insecto permite liberar a la plaga los agentes del control de plagas y como resultado se produce la regulación negativa de un gen diana en el hospedador. Los métodos de introducción oral pueden incluir por ejemplo, la mezcla directa de ARNbc con un alimento de la plaga, así como estrategias modificadas genéticamente en las que una especie que se usa como alimento se modifica genéticamente para que exprese el ARNbc o el ARNip, alimentando después a la plaga que va a afectarse. Por ejemplo, una bacteria, tal como *Lactobacillus*, puede transformarse con una secuencia diana y después alimentar a una plaga. En una realización, por ejemplo, las moléculas de ARNbc o ARNip, pueden incorporarse en la dieta del insecto, o aplicarse sobre la misma.

En otras realizaciones la plaga puede ponerse en contacto con una composición que contenga el ARNbc. La composición puede contener, además del ARNbc, excipientes, diluyentes o transportadores adicionales.

5 El ARNbc también puede incorporarse en el medio en el que se desarrolla o infesta la plaga. Por ejemplo, como un medio para inhibir la infestación de la plaga, un ARNbc puede incorporarse en un envase o envoltorio protector para alimentos. La madera puede tratarse, por ejemplo, con una solución que comprenda un ARNbc para impedir la infestación de la plaga.

En otras realizaciones, el ARNbc se expresa en una célula bacteriana o fúngica y las especies de insectos lo captan o la toman a través del alimento.

10 Como se ilustra en los ejemplos, las bacterias pueden modificarse genéticamente para producir cualquiera de ARNbc o las construcciones de ARNbc de la divulgación. Estas bacterias pueden ser el alimento de las especies de insectos. Cuando se captan, el ARNbc puede iniciar una respuesta de ARNi, lo que conduce a la degradación del ARNm diana y al debilitamiento o a la destrucción del insecto que se alimenta. Como alternativa, las bacterias o las células de levadura productoras de ARNbc pueden pulverizarse directamente sobre los cultivos.

15 Algunas bacterias tienen una interacción muy estrecha con la planta hospedadora, tal como, pero sin limitación, el *Rhizobium* simbiótico con leguminosas (por ejemplo soja). Dichas bacterias recombinantes podrían mezclarse con las semillas (por ejemplo, como un recubrimiento) y usarse como mejoradores de suelos.

También puede usarse un virus, tal como un baculovirus, que infecta específicamente a insectos. Esto garantiza la seguridad de mamíferos, especialmente de seres humanos, ya que los virus no infectaran al mamífero, de tal manera que no se producirá un efecto de ARNi no deseado.

20 Las posibles aplicaciones incluyen cultivos intensivos de invernadero, por ejemplo, cultivos que son menos interesantes desde un punto de vista de GMO, así como cultivos de campo más amplio, tales como soja.

25 Esta estrategia tiene diversas ventajas, por ejemplo: dado que no se presenta el problema de un posible troceado por un hospedador de plantas, esto permite la liberación de grandes fragmentos de ARNbc en el lumen intestinal de la plaga que se alimenta; el uso de bacterias como insecticidas no implica la generación de cultivos transgénicos, especialmente para determinados cultivos en los que son difíciles de obtener variantes transgénicas; hay una aplicación amplia y flexible en la que diferentes cultivos pueden tratarse simultáneamente en el mismo campo y/o diferentes plagas pueden dirigirse simultáneamente, por ejemplo combinando diferentes bacterias productoras de distintos ARNbc.

XI. Productos

30 Numerosos productos pueden incluir un ARNbc para su uso en el control de plagas, por ejemplo, se proporcionan composiciones farmacéuticas o veterinarias para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o infección de seres humanos o animales, respectivamente, causada por plagas. Dichas composiciones comprenden al menos una construcción de ARNbc o ARN, o una secuencia de nucleótidos o una construcción de ADN recombinante que codifica la construcción de ARNbc o ARN, en el que el ARN comprende cadenas complementarias hibridadas, una
35 de las cuales tiene una secuencia de nucleótidos que se corresponde a una secuencia de nucleótidos diana de un gen diana de la plaga que causa la enfermedad o infección, y al menos un transportador, excipiente o diluyente adecuado para el uso farmacéutico.

40 Como alternativa, puede usarse una composición farmacéutica o veterinaria como una composición adecuada para su uso tópico, tal como una aplicación sobre la piel de un animal o un ser humano. Por ejemplo, un ARNbc puede usarse en una composición líquida a aplicar en la piel como gotas, gel aerosol, crema, pomada, etc. Adicionalmente, un ARNbc puede integrarse en un parche transdérmico o en otro dispositivo médico para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección. Otras formas de dosificación farmacéuticas convencionales también pueden producirse, incluyendo comprimidos, cápsulas, pesarios, parches transdérmicos supositorios, etc. La forma
45 seleccionada dependerá de la naturaleza de la plaga diana y por tanto de la naturaleza de la enfermedad que se desea tratar.

Pueden producirse vacunas orales, por ejemplo, usando las construcciones y los métodos que se desvelan. Por ejemplo, produciendo un ARNbc en bacterias (por ejemplo *lactobacillus*) puede construirse una vacuna que puede incluirse en alimentos y que actúa como una vacuna oral contra infecciones causadas por insectos. Por
50 consiguiente, pueden desarrollarse construcciones y métodos para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o una afección causada por plagas, que comprende administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento y/o prevención, cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento, comprendiendo dicha composición al menos un ARN bicatenario o una construcción de ARN bicatenario que comprenda cadenas complementarias hibridadas, una de las cuales tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria, al menos en parte, a una secuencia de nucleótidos de un gen diana de plagas que causa la enfermedad o afección.

55 Aunque las composiciones pueden usarse para el tratamiento de una enfermedad o afección en un paciente, las composiciones y métodos también pueden usarse como un medio para proteger un sustrato o un material de la

infestación por plagas. La naturaleza de los excipientes incluidos en la composición y en la forma física de la misma puede variar dependiendo de la naturaleza del sustrato que se desee tratar.

5 Por ejemplo, dicha composición puede ser un recubrimiento o un polvo que puede aplicarse a un sustrato como un medio para proteger el sustrato de la infestación por un insecto y por lo tanto prevenir el daño inducido por la plaga al sustrato o al material. Por tanto, en una realización, la composición está en forma de un recubrimiento sobre una superficie adecuada a la que se adhiere, y eventualmente la ingiere un insecto que se pone en contacto con el recubrimiento. Dicha composición puede usarse para proteger cualquier sustrato o material que sea susceptible a infestación por o daño causado por una plaga, por ejemplo, comestibles y otros materiales perecederos, y sustratos tales como madera.

10 Por ejemplo, la composición puede ser un líquido con el que se cepilla, pulveriza o impregna el material o sustrato a tratar. Por tanto, un usuario puede pulverizar directamente al insecto o al sustrato con la composición.

15 Por ejemplo, las termitas, los escarabajos pulverizadores de madera y las hormigas carpinteras, pueden destruir casas y otros productos fabricados con madera. Tratando la madera o las fachadas de las casas con una composición que comprenda un ARNbc, puede ser posible reducir la infestación de la plaga. Del mismo modo, un tronco de un árbol puede tratarse con una composición que comprenda un ARNbc.

Los escarabajos de las flores, los gorgojos del grano, las polillas de la harina y otras plagas se alimentan de grano, cereales, pienso, chocolate en polvo almacenado y casi todo lo que se encuentre en la despensa de una cocina que no esté protegido. Por consiguiente, pueden desarrollarse medios para tratar cajas de cereales y otros envases que almacenen alimento y envolverlos con una composición que comprenda un ARNbc diana.

20 Las larvas de las polillas de textiles se alimentan de este material fabricado con productos de origen animal, tales como cuero, seda y lana. Por tanto, puede ser deseable tratar perchas, organizadores de armarios, y bolsas para ropa con el ARNbc. El piojo de los libros y el pececillo de plata son plagas que afectan a las bibliotecas ya que se alimentan de la cola de almidón de las encuadernaciones. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona composiciones para el tratamiento de libros que los proteja de la infestación y destrucción por las plagas.

25 En una realización, la composición está en forma de cebo. El cebo se diseña para atraer al insecto para que se ponga en contacto con la composición. Después de ponerse en contacto con el mismo, la composición se internaliza en el insecto, por digestión, por ejemplo, y actúa como mediadora en el ARNi para así destruir al insecto. El cebo puede depender de la especie que vaya a tratarse. También puede usarse un atrayente. El atrayente puede ser una feromona, tal como una feromona de macho o hembra, por ejemplo. El atrayente actúa atrayendo al insecto hacia el cebo y puede dirigirse a un insecto particular o puede atraer a una amplia variedad de insectos. El cebo puede tener cualquier forma adecuada, tal como forma de sólido, pasta, gránulo o polvo.

35 El cebo también puede transportarlo el insecto de regreso a la colonia. Después, el cebo puede actuar como una fuente de alimento para los restantes miembros de la colonia, proporcionando de este modo un control eficaz de una gran cantidad de insectos y posiblemente de toda una colonia de plagas de insectos. Esto es una ventaja asociada con el uso del ARN bicatenario o de bacterias que expresan el ARNbc, porque la acción retardada del ARNi actúa como mediadora sobre los efectos en las plagas permitiendo que el cebo se transporte de nuevo a la colonia, proporcionando de este modo un máximo impacto en términos de exposición a los insectos.

40 Los cebos pueden proporcionarse en una "carcasa" o "trampa" adecuada. Dichas carcacas y trampas se encuentran disponibles en el comercio y las trampas existentes pueden adaptarse para que incluyan las composiciones de la divulgación. La carcasa o trampa puede tener forma de caja, por ejemplo, y puede proporcionarse en un estado pre-formado o puede formarse, por ejemplo, con cartón plegable. Los materiales adecuados para la carcasa o trampa incluyen plásticos y cartón, particularmente cartón corrugado. Las superficies internas de las trampas pueden recubrirse con una sustancia adhesiva para restringir el movimiento del insecto una vez en su interior. La carcasa o trampa puede contener una depresión interna adecuada para sujetar el cebo en su sitio. Una trampa se diferencia de una carcasa porque el insecto no puede salir fácilmente de la trampa después de haber entrado, mientras que una carcasa actúa como una "estación de alimentación" que proporciona al insecto arácnido un entorno preferido en el que poder alimentarse y estar a salvo de los depredadores.

50 Está claro que numerosos productos y sustratos puede tratarse con las composiciones para reducir la infestación causada por plagas. Por supuesto, la naturaleza de los excipientes y la forma física de la composición puede variar dependiendo de la naturaleza del sustrato que se desee tratar. Por ejemplo, la composición puede ser un líquido con el que se cepille, pulverice o impregne el material o sustrato a tratar, o un recubrimiento que se aplique al material o al sustrato a tratar.

55 A continuación se proporcionan ejemplos específicos de métodos para identificar secuencias diana y para introducir las secuencias en varias células y composiciones. Estos pretenden ser ilustrativos y no limitaciones de la presente invención.

Ejemplo 1: Genes diana silenciadores de *C. elegans* en *C. elegans* en exploración de alto rendimiento

La genoteca completa de *C. elegans* se preparó en el vector pGN9A (WO 01/22121) entre dos promotores y terminadores de T7 idénticos, conduciendo su expresión en la dirección sentido y antisentido después de la expresión de la T7 polimerasa, que se indujo mediante IPTG.

5 Esta biblioteca se transformó en la cepa bacteriana AB301-105 (DE3) en formato de placas de 96 pocillos. Para la exploración del genoma completo, estas células bacterianas se alimentaron con la cepa *nuc-1* (e1392) de *C. elegans* deficiente en nucleasa.

10 El suministro de ARNbc producido en la cepa bacteriana AB301-105 (DE3), en gusanos *nuc-1* (e1392) de *C. elegans*, se realizó en un formato de placa de 96 pocillos de la siguiente manera: se transfirieron huevos de *nuc-1* a una placa distinta y se dejaron incubar simultáneamente a 20 °C durante una sincronización de la generación L1. Las placas de 96 pocillos se llenaron con 100 µL de medio de crecimiento líquido que comprendía IPTG y con 10 µL de cultivo celular bacteriano de DO₆₀₀ 1 AB301-105 (DE3) de la biblioteca de ARNbc de *C. elegans* portadora cada una de un vector con un fragmento genómico de *C. elegans* para la expresión del ARNbc. A cada pocillo, se añadieron 4 de los gusanos sincronizados de L1 y se incubaron a 25 °C durante al menos 4 a 5 días. Estos experimentos se realizaron por cuadruplicado. En la exploración se usaron 6 controles:

- 15 - pGN29 = control negativo, tipo silvestre
 - pGZ1 = *unc-22* = fenotipo con contracciones nerviosas
 - pGZ18 = quitina sintasa = letal embrionario
 - pGZ25 = *pos-1* = letal embrionario
 - pGZ59 = *bli-4D* = letal agudo
 20 - ACC = acetil co-enzima A carboxilasa = letal agudo

25 Después de 5 días, el fenotipo de los gusanos *nuc-1* (e1392) de *C. elegans* alimentados con las bacterias productoras del ARNbc se compararon con el fenotipo de gusanos alimentados con el vector vacío (pGN29) y los otros controles. Los gusanos que se habían alimentado con ARNbc se exploraron con respecto a la letalidad (aguda o larvaria) para la generación parental (Po), letalidad (embrionaria) para primera generación filial (F1), o para el retraso de crecimiento de Po de la siguiente manera: (i) Letalidad aguda de Po: Las L1 no se han desarrollado y se han muerto, este fenotipo nunca da progenie y los pocillos parecen vacíos; (ii) Letalidad (larvaria) de Po: Po murieron en un estadio posterior a L1, este fenotipo tampoco da progenie. Se encuentran larvas muertas o gusanos adultos muertos en los pocillos; (iii) Letalidad para F1: Las L1 se han desarrollado hasta el estadio adulto y están aún vivas. Este fenotipo no tiene progenie. Esto puede deberse a esterilidad, letalidad embrionaria (huevos muertos en la parte inferior del pocillo), detención embrionaria o detención larvaria (eventualmente termina siendo letal); (iv) Crecimiento detenido y retraso/retardo del crecimiento: Comparación con un pocillo con desarrollo normal y N° normal de progenie.

35 Para las secuencias diana que se presentan en la **Tabla 1A**, se llegó a la conclusión de que el silenciamiento del gen diana de *C. elegans* mediado por el ARNbc en nematodos, tales como *C. elegans*, tenía un efecto fatal sobre el crecimiento y la viabilidad de los gusanos.

40 Después del experimento anterior de silenciamiento con ARNbc, se llevó a cabo un experimento de fenotipado más detallado en *C. elegans* en un formato de alto rendimiento en placas de 24 pocillos. La biblioteca de ARNbc producida en la cepa bacteriana AB301-105 (DE3), tal como se describe anteriormente, se suministró a gusanos *C. elegans nuc-1* (e1392) en placas de 24 pocillos de la siguiente manera: se transfirieron huevos de *nuc-1* a una placa distinta y se dejaron incubar simultáneamente a 20 °C durante una sincronización de la generación L1. Posteriormente 100 de los gusanos L1 sincronizados se sumergieron en 500 µL de una mezcla de medio de alimentación completo S, que comprendía colesterol 5 µg/ml, PEG 4 µL/ml e IPTG 1 mM y 500 µL de cultivo celular bacteriano de DO₆₀₀ 1 AB301-105 (DE3) de la biblioteca de ARNbc de *C. elegans* portadora cada una de un vector con un fragmento genómico de *C. elegans* para la expresión del ARNbc. Se rotó a los gusanos de L1 sumergidos durante 2 horas a 25 °C.

50 Después de la centrifugación y retirada de 950 µL del sobrenadante, 5 µL del sedimento restante y resuspendido (que comprendía aproximadamente de 10 a 15 gusanos) se transfirieron a la mitad de cada pocillo de una placa de 24 pocillos, cargada con una capa de caldo LB agar. La placa inoculada se incubó a 25 °C durante 2 días. En la fase adulta, se individualizó 1 gusano adulto y se incubó a 25 °C durante 2 días para inspeccionar su progenie. Los gusanos adultos se inspeccionaron *in situ* en la placa de 24 pocillos original. Estos experimentos se realizaron por cuadruplicado.

Esta exploración fenotípica detallada se repitió con un segundo lote de gusanos, siendo la única diferencia que los gusanos del segundo lote se incubaron a 20 °C durante 3 días.

55 El fenotipo de los gusanos alimentados con ARNbc de *C. elegans* se comparó con el fenotipo de gusanos *C. elegans nuc-1* (e1392) alimentados con el vector vacío.

Basándose en este experimento, se llegó a la conclusión de que el silenciamiento de los genes diana de *C. elegans* como se representa en la **Tabla 1A** tenía un efecto fatal sobre el crecimiento y viabilidad de los gusanos y que este gen diana es esencial para la viabilidad de los nematodos. Por lo tanto, estos genes son buenos genes diana para

controlar (eliminar o evitar el crecimiento) a los nematodos mediante el silenciamiento génico mediado por ARNbc. Por consiguiente, la presente divulgación abarca el uso de ortólogos en nematodos del gen diana anterior de *C. elegans*, para controlar la infestación por nematodos en una variedad de organismos y materiales.

Ejemplo 2: Identificación de ortólogos de *D. melanogaster*

5 Tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior, se identificaron numerosas secuencias letales de *C. elegans* y pueden usarse para identificar ortólogos en otras especies y géneros. Por ejemplo, las secuencias letales de *C. elegans* pueden usarse para identificar secuencias ortólogas de *D. melanogaster*. Es decir, puede hacerse una búsqueda con cada secuencia de *C. elegans* contra una base de datos pública, tal como GenBank, para secuencias ortólogas en *D. melanogaster*. Se seleccionaron los ortólogos potenciales de *D. melanogaster* que compartían un alto grado de homología de secuencia (valor E preferentemente menor que o igual a 1E-30) y las secuencias son los mejores aciertos recíprocos de blast, esto último significa que las secuencias de organismos diferentes (por ejemplo, *C. elegans* y *D. melanogaster*) son los mejores aciertos blast entre sí. Por ejemplo, la secuencia C de *C. elegans* se comparó frente a secuencias en *D. melanogaster* usando BLAST. Si la secuencia C tiene la secuencia D de *D. melanogaster* como la mejor coincidencia y cuando D se compara con todas las secuencias de *C. elegans*, a su vez también con la secuencia C, entonces D y C son mejores coincidencias recíprocas. Este criterio se usa a menudo para definir la ortología, que significa secuencias similares de especies diferentes, que tienen función similar. Los identificadores de secuencia de *D. melanogaster* se representan en la **Tabla 1A**.

Ejemplo 3: *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la patata de Colorado)

A. Clonación de secuencias génicas parciales de *Leptinotarsa decemlineata*

20 Se aisló ARN intacto de alta calidad de 4 fases larvianas diferentes de *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la patata de Colorado; Fuente: Jeroen van Schaik, Entocare CV Biologische Gewasbescherming, Postbus 162, 6700 AD Wageningen, Países Bajos) usando reactivo TRIZOL[®] (Nº de Cat. 15596-026/15596-018, Invitrogen[™], Rockville, Maryland, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico presente en la preparación de ARN se retiró mediante tratamiento con DNasa siguiendo las instrucciones del fabricante (Nº de Cat. 1700, Promega[®]). El ADNc se generó usando un kit comercialmente disponible (Transcriptasa inversa SuperScript[®] III, Nº de Cat. 18080044, Invitrogen[™], Rockville, Maryland, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar secuencias de ADNc que comprendían una porción de los genes LD001, LD002, LD003, LD006, LD007, LD010, LD011, LD014, LD015, LD016 y LD018, se realizó una serie de reacciones PCR con cebadores degradados usando Ampliqaq Gold[®] (Nº de Cat. N8080240, Applied Biosystems[®]) siguiendo las instrucciones del fabricante.

30 Las secuencias de los cebadores degradados usados para la amplificación de cada uno de los genes se proporcionan en la **Tabla 2-LD**, que muestra genes diana de *Leptinotarsa decemlineata* que incluyen las secuencias cebadoras y las secuencias de ADNc obtenidas. Estos cebadores se usaron en respectivas reacciones PCR con las siguientes condiciones: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. Los fragmentos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa, purificado (Kit de extracción de gel QIAquick[®], Nº de Cat. 28706, Qiagen[®]), se clonaron en el vector pCR8/GW/TOPO[®] (Nº de Cat. K2500 20, Invitrogen[™]) y se secuenciaron. Las secuencias de los productos PCR resultantes se representan mediante las SEC ID Nº respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 2-LD** y se citan como las secuencias parciales. Las secuencias de aminoácidos parciales correspondientes se representan por las SEC ID Nº respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 3-LD**, en la que el inicio de la fase de lectura se indica entre paréntesis.

B. Producción de ARNbc de los genes de *Leptinotarsa decemlineata*

Se sintetizó ARNbc en cantidades de miligramo usando el kit comercialmente disponible Sistema de ARNi T7 Ribomax[™] Express (Nº de Cat. P1700, Promega[®]). En primer lugar se generaron por separado dos moldes promotores de ARN polimerasa T7 en dirección 5' individuales en dos reacciones PCR individuales, conteniendo cada una la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor de T7.

Para cada uno de los genes diana, se generó el molde de T7 en sentido usando cebadores directo e inverso específicos de T7. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-LD**. Las condiciones de las reacciones PCR fueron las siguientes: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El molde de T7 antisentido se generó usando cebadores directos e inversos de T7 específicos en una reacción PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde anti-sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-LD**. Los productos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa y se purificaron mediante el kit de purificación PCR (kit de purificación PCR Qiaquick[®], Nº de Cat. 28106, Qiagen[®]) y precipitación con NaClO₄. Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclaron para transcribirse y las hebras de ARN resultantes se hibridaron, se trataron con DNasa y RNasa y se purificaron con acetato de sodio, siguiendo las instrucciones del fabricante. La hebra sentido del ARNbc resultante para cada uno de los genes diana se proporciona en la **Tabla 8-LD**. La **Tabla 8-LD** presenta secuencias para la preparación de fragmentos de ARN de secuencias diana de

Leptinotarsa decemlineata y secuencias de concatémero, incluyendo secuencias cebadoras.

C. Exploración de dianas de ARNbc usando dieta artificial para la actividad contra *Leptinotarsa decemlineata*

5 Se preparó dieta artificial para el escarabajo de la patata de Colorado de la siguiente manera (adaptada de Gelman et al., 2001, J. Ins. Sc., vol. 1, N° 7, 1-10): se esterilizaron en autoclave el agua y el agar, y los demás ingredientes (mostrados en la Tabla 2 más adelante) se añadieron cuando la temperatura descendió a 55 °C. A esta temperatura, los ingredientes se mezclaron bien antes de dividir la dieta en alícuotas en placas de 24 pocillos (Nunc™) con una cantidad de 1 ml de diete por pocillo. Se dejó solidificar la dieta artificial por enfriamiento a temperatura ambiente. La dieta se almacenó a 4 °C durante hasta tres semanas.

Tabla 2: Ingredientes para la dieta artificial

Ingredientes	Volumen para 1 l
agua	768 ml
agar	14 g
copos de avena laminados	40 g
levadura de Tóruła	60 g
hidrolizado de lactalbúmina	30 g
caseína	10 g
fructosa	20 g
mezcla salina de Wesson	4 g
polvo de fruto de tomate	12,5 g
hoja de patata en polvo	25 g
b-sitosterol	1 g
ácido sórbico	0,8 g
Metil parabeno	0,8 g
mezcla de vitaminas de Vanderzant	12 g
sulfato de neomicina	0,2 g
aureomicina	0,130 g
rifampicina	0,130 g
cloranfenicol	0,130 g
nistatina	0,050 g
aceite de soja	2 ml
aceite de germen de trigo	2 ml

10 Se aplicaron cincuenta µl de una solución de ARNbc a una concentración de 1 mg/ml por vía tópica sobre la dieta artificial sólida en los pocillos de la placa multipocillo. La dieta se secó en una cabina de flujo laminar. Por tratamiento, se ensayaron veinticuatro larvas de escarabajo de la patata de Colorado (2° estadio), con dos insectos por pocillo. Las placas se conservaron en la cámara de cría de insectos a una temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa del 60 %, con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Se evaluó a los escarabajos como vivos o muertos cada 1, 2 o 3 días. Después de siete días, para las dianas LD006, LD007, LD010, LD011 y LD014, la dieta se reemplazó por dieta nueva con ARNbc aplicado por vía tópica a la misma concentración (1 mg/ml); para las dianas LD001, LD002, LD003, LD015 y LD016, la dieta se reemplazó solo por dieta reciente. Los ARNbc diana se compararon con solo con dieta o dieta con ARNbc aplicado por vía tópica correspondiente a un fragmento de la secuencia codificante de la GFP (proteína fluorescente verde) (SEC ID N°: 235).

15 La alimentación con dieta artificial que contenía los ARNbc desnudos a larvas de *L. decemlineata* dio como resultado aumentos significativos en la mortalidad de las larvas como se indica en dos bioensayos separados (Figuras 1LD-2LD).

Todos los ARNbc ensayados dieron como resultado finalmente una mortalidad del 100 % después de 7 a 14 días. La dieta con o sin ARNbc de GFP mantuvo a los insectos a lo largo del bioensayo con poca o sin mortalidad.

25 Típicamente, en todos los ensayos observados, las larvas de EPC de segundo estadio se alimentaron normalmente con dieta con o sin ARNbc durante 2 días y cambiaron al tercer estadio larvario. En este nuevo estadio larvario, se observó que los EPC reducían significativamente o del todo su alimentación, con un aumento en la mortalidad como resultado.

30 D. Bioensayo de dianas de ARNbc usando discos foliares de patata para actividad contra *Leptinotarsa decemlineata*

Se empleó un método de bioensayo alternativo usando material foliar de patata en lugar de dieta artificial como fuente de alimentación para los EPC. Se cortaron discos de aproximadamente 1,1 cm de diámetro (o 0,95 cm²) de hojas de plantas de patata de 2 a 3 de vida usando un horador de corteza de tamaño adecuado. Los discos foliares tratados se prepararon aplicando 20 µl de una solución de 10 ng/µl de ARNbc de LD002 diana o ARNbc de gfp de control en la superficie foliar adaxial. Se dejó que los discos foliares se secasen y se colocaron individualmente en 24 pocillos de una

multiplaca de 24 pocillos (Nunc™). Se colocó en cada pocillo un solo EPC de segundo estadio larvario, que después se cubrió con papel de tejido y una tapa de plástico multipocillo. La placa que contenía los insectos y los discos foliares se mantuvo en una cámara de insectos a 28 °C con un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad. Se dejó que los insectos se alimentasen de los discos foliares durante 2 días, tras los cuales se transfirieron los insectos a una nueva placa que contenía discos foliares tratados recientes. A continuación, los insectos se transfirieron a una placa que contenía discos foliares no tratados cada día hasta el día 7. Se registraron las puntuaciones de mortalidad y peso de los insectos.

La alimentación con discos foliares de patata con ARNbc desnudo intacto aplicado sobre la superficie de LD002 diana a larvas de *L. decemlineata* dio como resultado un aumento significativo en la mortalidad larvaria (es decir, en el día 7 todos los insectos estaban muertos; mortalidad del 100 %) mientras que el ARNbc de gfp de control no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia del EPC. El ARNbc de LD002 diana afectó gravemente al crecimiento de las larvas después de 2 a 3 días mientras que las larvas alimentadas con ARNbc de gfp a la misma concentración se desarrollaron como normales (**Figura 3-LD**).

E. Exploración de versiones más cortas de los ARNbc usando dieta artificial con respecto a la actividad contra *Leptinotarsa decemlineata*

Este ejemplo ilustra el descubrimiento de que fragmentos de ARNbc más cortos (60 o 100 pb) por sí mismos o como construcciones de concatémero son suficientes para causar toxicidad para el escarabajo de la patata de Colorado.

Para este ejemplo se seleccionó LD014, una diana que se sabe que induce letalidad en el escarabajo de la patata de Colorado. Este gen codifica una subunidad E de V-ATPasa (SEC ID N°: 15).

Un fragmento de 100 pares de bases, LD014_F1, en la posición 195-294 en la SEC ID N°: 15 (SEC ID N°: 159) y un fragmento de 60 pares de bases, LD014_F2, en la posición 235-294 en la SEC ID N°: 15 (SEC ID N°: 160) se seleccionaron adicionalmente. Véase también la **Tabla 7-LD**.

Se diseñaron dos concatémeros de 300 pares de bases, LD014_C1 y LD014_C2, (SEC ID N°: 161 y SEC ID N°: 162). LD014_C1 contenía 3 repeticiones del fragmento de 100 pares de bases descrito anteriormente (SEC ID N°: 159) y LD014_C2 contenía 5 repeticiones del fragmento de 60 pares de bases descrito anteriormente (SEC ID N°: 160). Véase también la **Tabla 7-LD**.

Los fragmentos LD014_F1 y LD014_F2 se sintetizaron como cebadores en sentido y antisentido. Estos cebadores se hibridaron para crear las moléculas de ADN bicatenario antes de la clonación. Se incluyeron los sitios de restricción *Xba*I y *Xma*I en los extremos 5' y 3' de los cebadores, respectivamente, para facilitar la clonación.

Los concatémeros se produjeron como genes sintéticos de 300 pares de bases. Se incluyeron los sitios de restricción *Xba*I y *Xma*I en los extremos 5' y 3' de los fragmentos de ADN sintéticos, respectivamente, para facilitar la clonación.

Las 4 moléculas de ADN, es decir, las 2 unidades sencillas (LD014_F1 y LD014_F2) y los 2 concatémeros (LD014_C1 y LD014_C2), se sometieron a digestión con *Xba*I y *Xma*I y se subclonaron en pBluescriptII SK+ linealizado con digestiones de *Xba*I y *Xma*I, dando como resultado plásmidos recombinantes p1, p2, p3 y p4, respectivamente.

Producción de ARN bicatenario: se sintetizó ARNbc usando el kit comercialmente disponible Sistema de ARNi T7 Ribomax™ Express. En primer lugar se generaron por separado dos moldes promotores de ARN polimerasa T7 en dirección 5' individuales en dos reacciones PCR individuales, conteniendo cada una la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor de T7. Para LD014_F1, se generó el molde de T7 en sentido usando el cebador directo específico de T7 oGBM159 y el cebador inverso específico oGBM164 (representados en el presente documento como SEC ID N°: 204 y SEC ID N°: 205, respectivamente) en una reacción PCR con las siguientes condiciones: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El molde de T7 antisentido se generó usando el cebador directo específico oGBM163 y el cebador inverso específico de T7 oGBM160 (representado en el presente documento como SEC ID N°: 206 y SEC ID N°: 207, respectivamente) en una reacción PCR con las mismas condiciones descritas anteriormente. Los productos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa y se purificaron mediante el kit de purificación PCR (kit de purificación PCR Qiaquick®) y precipitación de NaClO₄. Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclaron para transcribirse y las hebras de ARN resultantes se hibridaron, se trataron con DNasa y RNasa y se purificaron con acetato de sodio, siguiendo las instrucciones del fabricante. La hebra sentido del ARNbc resultante se representa en el presente documento por SEC ID N°: 203.

Para LD014_F2, se generó el molde de T7 en sentido usando el cebador directo específico de T7 oGBM161 y el cebador inverso específico oGBM166 (representados en el presente documento como las SEC ID N°: 209 y SEC ID N°: 210, respectivamente) en una reacción PCR con las siguientes condiciones: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El molde de T7 antisentido se generó usando el cebador directo específico oGBM165 y el cebador inverso específico de T7 oGBM162 (representado en el presente documento como SEC ID N°: 211 y SEC ID N°: 212, respectivamente) en una reacción PCR con las mismas condiciones descritas anteriormente. Los productos PCR resultantes se

analizaron en gel de agarosa y se purificaron mediante el kit de purificación PCR (kit de purificación PCR Qiaquick®) y precipitación de NaClO₄. Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclaron para transcribirse y las hebras de ARN resultantes se hibridaron, se trataron con DNasa y RNasa y se purificaron con acetato de sodio, siguiendo las instrucciones del fabricante. La hebra sentido del ARNbc resultante se representa en el presente documento por SEC ID N°: 208.

También para los concatémoros, se generaron por separado dos moldes promotores de ARN polimerasa T7 en dirección 5' individuales en dos reacciones PCR individuales, conteniendo cada una la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor de T7. Los plásmidos recombinantes p3 y p4 que contenían LD014_C1 y LD014_C2 se linealizaron con *Xba*I o *Xma*I, los dos fragmentos lineales para cada construcción se purificaron y se usaron como molde para el ensayo de transcripción *in vitro*, usando los promotores de T7 que flanqueaban a los sitios de clonación. Se preparó ARN bicatenario mediante transcripción *in vitro* usando Sistema de ARNi T7 RiboMAX™ Express. Las hebras sentido de los ARNbc resultantes para LD014_C1 y LD014_C2 se representan en el presente documento por SEQ ID NO:: 213 y SEC ID N°:: 214, respectivamente.

Secuencias más cortas de LD014 diana y concatémoros fueron capaces de inducir letalidad en *Leptinotarsa decemlineata*, tal como se muestra en la **Figura 4-LD**.

F. Exploración de los ARNbc a diferentes concentraciones usando dieta artificial para actividad contra *Leptinotarsa decemlineata*

Cincuenta µl de una solución de ARNbc a concentraciones en serie de factor 10 de 1 µg/µl (para LD027 diana a partir de 0,1 µg/µl) hasta 0,01 ng/µl se aplicaron por vía tópica en la dieta artificial sólida en los pocillos de una placa de 24 pocillos (Nunc™). La dieta se secó en una cabina de flujo laminar. Por tratamiento, se ensayaron veinticuatro larvas de escarabajo de la patata de Colorado (2° estadio), con dos insectos por pocillo. Las placas se conservaron en la cámara de cría de insectos a una temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa del 60 %, con un fotoperíodo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Se evaluó a los escarabajos como vivos o muertos a intervalos regulares hasta el día 14. Después de siete días, la dieta se reemplazó por dieta nueva con ARNbc aplicado por vía tópica a las mismas concentraciones. Los ARNbc diana se compararon con dieta sola.

La alimentación con dieta artificial que contenía los ARNbc desnudos intactos de diferentes dianas a larvas de *L. decemlineata* dio como resultado mortalidades larvianas elevadas a concentraciones tan bajas como entre 0,1 y 10 ng de ARNbc/µl tal como se muestra en la **Figura 5-LD**.

G. Clonación de un fragmento génico de EPC en un vector adecuado para la producción bacteriana de ARN bicatenario activo en insectos

Aunque puede usarse cualquier promotor bacteriano eficaz, se clonó un fragmento de ADN correspondiente a una diana génica de EPC en un vector para la expresión de ARN bicatenario en un hospedador bacteriano (véase el documento WO 00/01846).

Las secuencias de los cebadores específicos usados para la amplificación de los genes diana se proporcionan en la Tabla 8. El molde usado es el vector pCR8/GW/TOPO® que contiene cualquiera de las secuencias diana. Los cebadores se usan en una reacción PCR con las siguientes condiciones: 5 minutos a 98 °C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El fragmento PCR resultante se analizó en gel de agarosa, se purificó (Kit de extracción de gel QIAquick®), se clonó en su extremo 3' en vector pGNA49A linealizado con *Srf* I (referencia al documento WO00188121A1) y se secuenció. La secuencia del producto PCR resultante corresponde a la secuencia respectiva tal como se proporciona en la Tabla 8. El vector recombinante que porta esta secuencia se denomina pGBNJ003.

Las secuencias de los cebadores específicos usados para la amplificación del fragmento génico LD010 se proporcionan en la Tabla 8 (cebador directo SEC ID N°: 191 y cebador inverso SEC ID N°: 190). El molde usado era el vector pCR8/GW/TOPO® que contenía la secuencia LD010 (SEC ID N°: 11). Los cebadores se usaron en una reacción PCR con las siguientes condiciones: 5 minutos a 98 °C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El fragmento PCR resultante se analizó en gel de agarosa, se purificó (Kit de extracción de gel QIAquick®), se clonó en su extremo 3' en vector pGNA49A linealizado con *Srf* I y se secuenció. La secuencia del producto PCR resultante corresponde a la SEC ID N°: 188 tal como se proporciona en la Tabla 8. El vector recombinante que porta esta secuencia se denominó pGBNJ003.

H. Expresión y producción de una diana de ARN bicatenario en dos cepas de *Escherichia coli*: (1) AB301-105(DE3), y, (2) BL21(DE3)

Se siguieron los procedimientos descritos a continuación para expresar niveles adecuados de ARN bicatenario activo en insectos de LD010 diana en bacterias. Se usó una cepa deficiente en RNasalll, AB301-105(DE3), en comparación con bacterias que contenían RNasalll de tipo silvestre, BL21(DE3).

Transformación de AB301-105(DE3) y BL21(DE3)

Se añadieron trescientos ng del plásmido y se mezclaron suavemente en una alícuota de 50 μ l de la cepa de *E. coli* químicamente competente enfriada en hielo AB301-105(DE3) o BL21(DE3). Las células se incubaron sobre hielo durante 20 minutos antes de someterlas a un tratamiento de choque térmico de 37 °C durante 5 minutos, después de los cuales se pusieron de nuevo sobre hielo durante 5 minutos adicionales. Se añadieron cuatrocientos cincuenta μ l de medio SOC a temperatura ambiente a las células y la suspensión se incubó en un agitador (250 rpm) a 37 °C durante 1 hora. Se transfirieron cien μ l de la suspensión de células bacterianas a un matraz cónico de 500 ml que contenía 150 ml de caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido suplementado con 100 μ g/ml de antibiótico de carbenicilina. El cultivo se incubó en un agitador Innova® 4430 (250 rpm) a 37 °C durante toda la noche (16 a 18 horas).

10 *Inducción química de la expresión de ARN bicatenario en AB301-105(DE3) y BL21(DE3)*

La expresión de ARN bicatenario del vector recombinante pGBNJ003, en la cepa bacteriana AB301-105(DE3) o BL21(DE3) fue posible ya que estaban presentes todos los componentes genéticos para expresión controlada. En presencia del inductor químico isopropiltiogalactósido, o IPTG, la polimerasa T7 dirigirá la transcripción de la secuencia diana en direcciones tanto antisentido como sentido ya que estas están flanqueadas por promotores de T7 orientados de manera opuesta.

La densidad óptica a 600 nm del cultivo bacteriano de una noche se midió usando un espectrofotómetro adecuado y se ajustó a un valor de 1 mediante la adición de caldo LB reciente. Se transfirieron cincuenta ml de este cultivo a un tubo Falcon™ de 50 ml y el cultivo se centrifugó después a 3000 g a 15 °C durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 50 ml de medio completo S reciente (medio SNC más 5 μ g/ml de colesterol) suplementado con 100 μ g/ml de carbenicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias se indujeron durante 2 a 4 horas a temperatura ambiente.

Tratamiento con calor de bacterias

Las bacterias se destruyeron mediante tratamiento con calor para minimizar el riesgo de contaminación de la dieta artificial en las placas de ensayo. Sin embargo, el tratamiento con calor de las bacterias que expresaban ARN bicatenario no es un requisito previo para inducir la toxicidad hacia los insectos debido a la interferencia de ARN. El cultivo bacteriano inducido se centrifugó a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se sometió a 80 °C durante 20 minutos en un baño con agua. Después del tratamiento con calor, el sedimento bacteriano se resuspendió en 1,5 ml de agua MilliQ y la suspensión se transfirió a un tubo de microcentrifuga. Se prepararon y usaron diversos tubos en los bioensayos para cada renovación. Los tubos se conservaron a -20 °C hasta su uso posterior.

I. Ensayos de laboratorio para probar *Escherichia coli* que expresan el ARNbc diana de LD010 contra *Leptinotarsa decemlineata*

Se emplearon dos métodos de bioensayo para ensayar el ARN bicatenario producido en *Escherichia coli* contra larvas del escarabajo de la patata de colorado: (1) bioensayo basado en dieta artificial, y, (2) bioensayo basado en plantas.

Bioensayos basado en dieta artificial

Se preparó una dieta artificial para el escarabajo de la patata de Colorado como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4. Se dispensó medio mililitro de dieta en cada uno de los pocillos de una placa de ensayo multipocillo de 48 pocillos (Nunc™). Para cada tratamiento, se aplicaron cincuenta μ l de una suspensión de bacterias tratadas con calor de DO 1 (que es equivalente a 5×10^7 células bacterianas) que expresaban ARNbc por vía tópica en la dieta sólida en los pocillos y se dejaron secar las placas en una cabina de flujo laminar. Por tratamiento, se ensayaron cuarenta y ocho larvas de escarabajo de la patata del colorado de 2º estadio, una por cada pocillo que contenía dieta y bacterias. Cada fila de una placa (es decir, 8 pocillos) se consideró como un replicado. Las placas se mantuvieron en la cámara de cría de insectos a una temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa del 60 ± 5 %, con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Después de cada 4 días, se transfirieron los escarabajos a dieta reciente que contenía bacterias aplicadas por vía tópica. Los escarabajos se evaluaron como vivos o muertos cada día o tres días después de la infestación. Para los supervivientes, se registró el crecimiento y desarrollo en términos de peso larvario en el día 7 después de la infestación.

Para la cepa de *E. coli* AB301-105(DE3) deficiente en RNasIII, se ensayaron las bacterias que contenían el plásmido pGBNJ003 y aquellas que contenían el vector vacío pGN29 (referencia al documento WO 00/188121A1) en bioensayos para toxicidad en EPC. Las bacterias que portaban el plásmido pGBNJ003 mostraron un claro aumento en la mortalidad de insectos a lo largo del tiempo, mientras que se observó muy poca o ninguna mortalidad para pGN29 y control de solo dieta (**Figuras 6a-LD y 7a-LD**). El crecimiento y desarrollo de supervivientes larvarios del escarabajo de la patata de Colorado, 7 días después de la alimentación con una dieta artificial que contenía bacterias que expresaban ARNbc de LD010 diana, estaba gravemente impedido (**Tabla 10-LD, Figura 8a-LD**).

Para la cepa de *E. coli* BL21(DE3), se ensayaron bacterias que contenían plásmido pGBNJ003 y aquellas que contenían el vector vacío pGN29 contra las larvas del escarabajo de la patata de Colorado. Se observaron efectos

perjudiciales similares en las larvas alimentadas con dieta suplementada con bacterias BL21(DE3) al igual que para la cepa deficiente en RNasalll, AB301-105(DE3) (**Figuras 6b-LD y 7b-LD**). Sin embargo, el número de supervivientes para los cinco clones fue mayor para BL21(DE3) que para AB301-105(DE3); en el día 12, los valores promedio de mortalidad fueron aproximadamente un 25 % menores para esta cepa en comparación con la cepa deficiente en RNasalll. Asimismo, los pesos promedio de los supervivientes alimentados con dieta que contenía BL21(DE3) que expresaba ARNbc correspondiente a LD010 diana se vieron gravemente reducidos (**Tabla 10-LD, Figura 8b-LD**).

El retraso en el crecimiento y desarrollo de las larvas de EPC alimentadas con una dieta que contenía cualquiera de las dos cepas bacterianas que alojaban el plásmido pGBNJ003 estaba directamente correlacionado con la inhibición de la alimentación dado que no se observaban excrementos en los pocillos de placas recientes del día 4 en adelante cuando se compararon con bacterias que portaban el vector vacío pGN29 o las de la placa de solo dieta. Esta observación fue similar a aquella en la que se alimentó a los EPC con ARN bicatenario transcrito *in vitro* aplicado por vía tópica a la dieta artificial (véase el Ejemplo 3D); en este caso, el cese de la alimentación se produjo desde el día 2 en adelante en los tratados con dieta.

15 *Bioensayos basados en plantas*

Se roció a plantas de patata enteras con suspensiones de bacterias químicamente inducidas que expresaban ARNbc antes alimentar a larvas de EPC con las plantas. Las plantas de patata de la variedad "línea 5" se desarrollaron a partir de tubérculos hasta el estadio de 8-12 hojas desplegadas en una cámara de cultivo de plantas con las siguientes condiciones: 25 ± 2 °C, humedad relativa del 60 %, fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Las plantas se cubrieron colocando una botella de plástico de 500 ml boca abajo sobre la planta con el cuello de la botella firmemente colocado en el suelo en una maceta y se recortó la base y se cubrió con una fina malla de nailon para permitir el aireamiento, reducir la condensación en su interior e impedir que se escapen las larvas. Se colocaron quince larvas de escarabajo de la patata de Colorado en el estadio larvario L1 en cada planta tratada en la jaula. Las plantas se trataron con una suspensión de *E. coli* AB301-105(DE3) que portaban los plásmidos pGBNJ003 (clon 1; **Figura 7a-LD**) o el plásmido pGN29 (clon 1; véase el **Figura 7a-LD**). Se aplicaron diferentes cantidades de bacterias a las plantas: 66, 22 y 7 unidades, donde una unidad se define como 10^9 células bacterianas en 1 ml de una suspensión bacteriana a un valor de densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 600 nm. En cada caso, se roció un volumen total de 1,6 ml sobre la planta con la ayuda de un vaporizador. Se usó una planta por tratamiento en ese ensayo. Se contó el número de supervivientes y se registró el peso de cada superviviente.

El rociado de las plantas con una suspensión de la cepa bacteriana de *E. coli* AB301-105(DE3) que expresaba ARNbc diana de pGBNJ003 dio lugar a un drástico aumento en la mortalidad de los insectos en comparación con el control de pGN29. El recuento de mortalidad se mantuvo cuando la cantidad de suspensión celular bacteriana se diluyó 9 veces (**Figura 9-LD**). Los pesos promedio de los supervivientes larvarios en el día 11 en las plantas rociadas con bacterias que portaban el vector pGBNJ003 eran aproximadamente 10 veces menores que los de aquellos de pGN29 (**Figura 10-LD**). El daño por la alimentación de las larvas de EPC en la planta de la patata rociada con bacterias que contenían el plásmido pGBNJ003 estaba muy reducido en comparación con el daño ocasionado a una planta de patata pulverizada con bacterias que contenían el vector vacío pGN29 (**Figura 11-LD**).

Estos experimentos demostraron que el ARN bicatenario correspondiente a una secuencia diana de gen de insecto producida en sistemas de expresión de tipo silvestre o deficientes en RNasalll es tóxico para el insecto en cuanto a aumentos sustanciales en la mortalidad de los insectos y en el retraso en el crecimiento/desarrollo para los supervivientes larvarios. También está claro a partir de estos experimentos que se proporciona un ejemplo para proteger eficazmente a plantas/cultivos del daño por insectos mediante el uso de una pulverización de una formulación que consiste en bacterias que expresan ARN bicatenario correspondiente a un gen diana de insecto.

45 **J. Ensayo de diversas densidades de cultivo en suspensión de *Escherichia coli* que expresan ARNbc de diana de LD010 contra *Leptinotarsa decemlineata***

La preparación y tratamiento de cultivos bacterianos se describen en el Ejemplo 3J. Se aplicaron diluciones en serie de factor tres de cultivos (comenzando a partir de 0,25 unidades equivalentes) de la cepa de *Escherichia coli* deficiente en RNasalll AB301-105(DE3) que expresaba ARN bicatenario de LD010 diana al follaje de la planta de la patata de la variedad "Bintje" en el estadio de 8-12 hojas desplegadas. Se colocaron diez larvas de L1 de *L. decemlineata* sobre las plantas tratadas con una planta por tratamiento. La puntuación de la mortalidad de insectos y el impedimento del crecimiento se realizó en el día 7 (es decir, 7 días después de la infestación).

Tal como se muestra en la **Figura 14-LD**, se registró una alta mortalidad larvaria de EPC (del 90 al 100 %) después de 1 semana cuando se alimentó a los insectos con plantas de patata tratadas con una aplicación tópica mediante una fina pulverización de cultivos inactivados por calor de *E. coli* que portaban plásmido pGBNJ003 (para la expresión de ARNbc de diana 10) a densidades de 0,25, 0,08 y 0,025 unidades bacterianas. A 0,008 unidades, aproximadamente un tercio de los insectos estaban muertos, sin embargo, los insectos supervivientes eran significativamente más pequeños que aquellos en los grupos de control (*E. coli* que portaba el vector vacío pGN29 y solo agua). El daño por la alimentación de las larvas de EPC en la planta de la patata rociada con bacterias que

contenían el plásmido pGBNJ003 a concentraciones de 0,025 o 0,008 unidades estaba muy reducido en comparación con el daño ocasionado a una planta de patata pulverizada con bacterias que contenían el vector vacío pGN29 (**Figura 15-LD**).

K. Los adultos son extremadamente susceptibles al ARNbc ingerido por vía oral correspondiente a genes diana.

El ejemplo proporcionado a continuación destaca el descubrimiento de que los insectos adultos (y no solo insectos en el estadio larvario) son extremadamente susceptibles al ARNbc ingerido por vía oral correspondiente a genes diana.

Se seleccionaron cuatro genes para este experimento: dianas 2, 10, 14 y 16 (SEC ID N°: 168, 188, 198 y 220, respectivamente). Se usó como control ARNbc de un fragmento de GFP (SEC ID N°: 235). Se cogieron al azar adultos jóvenes (de 2 a 3 días de vida) del cultivo de cría en laboratorio sin sesgo hacia el género del insecto. Se seleccionaron diez adultos por tratamiento. Los adultos se mantuvieron previamente en ayuno durante al menos 6 horas antes del comienzo del tratamiento. En el primer día del tratamiento, se dio de comer a cada adulto cuatro discos foliares de patata (1,5 cm² de diámetro) que se habían tratado previamente con una aplicación tópica de 25 µl de ARNbc diana a 0,1 µg/µl (sintetizado tal como se describe en el Ejemplo 3A; aplicación tópica tal como se describe en el Ejemplo 3E) por disco. Se confinó a cada adulto en una placa de Petri pequeña (3 cm de diámetro) para asegurarse de que todos los insectos habían ingerido cantidades iguales de alimento y por lo tanto recibían las mismas dosis de ARNbc. Al día siguiente se alimentó de nuevo a cada adulto con cuatro discos foliares tratados tal como se ha descrito anteriormente. En el tercer día, se recogieron los diez adultos por tratamiento y se colocaron juntos en una jaula que consistía en una caja de plástico (dimensiones 30 cm x 20 cm x 15 cm) con una fina malla de nailon incorporada en la tapa para proporcionar buena ventilación. Dentro de la caja, se colocó en la base cierta cantidad de papel de filtro humedecido. Se colocó cierta cantidad de follaje de patata (no tratado) sobre el papel para mantener a los adultos durante el experimento. A partir del día 5, se llevaron a cabo evaluaciones regulares para contar el número de insectos muertos, vivos (que se movían) y moribundos. Para evaluar si los insectos estaban moribundos, se colocó a los adultos sobre sus dorsos para comprobar si eran capaces de volver a colocarse en varios minutos; se consideró que un insecto estaba moribundo solo si no era capaz darse la vuelta.

En este experimento se demostraron efectos tóxicos específicos evidentes del ARN bicatenario correspondiente a diferentes dianas en adultos del escarabajo de la patata de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, (**Figure 12-LD**). El ARN bicatenario correspondiente a un fragmento de *gfp* no mostró toxicidad hacia adultos de EPC en el día de la valoración final (día 19). Este experimento demostró claramente que la supervivencia de adultos de EPC se redujo gravemente solo tras unos días de exposición a ARNbc cuando se administró por vía oral. Por ejemplo, para la diana 10, en el día 5, 5 de 10 adultos estaban moribundos (enfermos y se movían lentamente); en el día 6, 4 de cada 10 adultos estaban muertos con tres de los supervivientes moribundos; en el día 9, todos los adultos observados estaban muertos.

Como consecuencia de este experimento, la aplicación de los ARN bicatenarios diana contra plagas de insectos pueden ampliarse para incluir las dos fases vitales de una plaga de insecto (es decir, larvas y adultos) que pueden ocasionar un amplio daño a los cultivos, como es el caso del escarabajo de la patata de Colorado.

Ejemplo 4: *Phaedon cochleariae* (escarabajo de la hoja de mostaza)

A. Clonación de una secuencia parcial de los genes de *Phaedon cochleariae* (escarabajo de la hoja de mostaza) PC001, PC003, PC005, PC010, PC014, PC016 y PC027 mediante PCR de familia

Se aisló ARN intacto de alta calidad a partir del estadio larvario de *Phaedon cochleariae* (escarabajo de la hoja de mostaza; Fuente: Dr. Caroline Muller, Julius-von-Sachs-Institute for Biosciences, Chemical Ecology Group, University of Wuerzburg, Julius-von-Sachs-Platz 3, D-97082 Wuerzburg, Alemania) usando reactivo TRIzol[®] siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico presente en la preparación de ARN se retiró mediante tratamiento con DNasa siguiendo las instrucciones del fabricante. Se generó ADNc usando un kit comercialmente disponible (transcriptasa inversa SuperScript[®] III) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar secuencias de ADNc que comprendían una porción de los genes PC001, PC003, PC005, PC010, PC014, PC016 y PC027, se realizó una serie de reacciones PCR con cebadores degradados usando Amplitaq Gold[®] siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las secuencias de los cebadores degradados usados para la amplificación de cada uno de los genes se proporcionan en la **Tabla 2-PC**. La Tabla 2-PC muestra genes diana de *Phaedon cochleariae* que incluyen secuencias cebadoras y secuencias de ADNc obtenidas. Estos cebadores se usaron en respectivas reacciones PCR con las siguientes condiciones: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. Los fragmentos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa, se purificó (Kit de extracción de gel QIAquick[®]), se clonaron en el vector pCR4/TOPO[®] (N° de Cat. K4530-20, Invitrogen[™]) y se secuenciaron. Las secuencias de los productos PCR resultantes se representan mediante las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 2-PC** y se citan como las secuencias parciales.

Las secuencias de aminoácidos parciales correspondientes se representan por las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 3-PC**, La Tabla 3-PC proporciona secuencias de aminoácidos de clones de ADNc y el inicio de la fase de lectura se indica entre paréntesis.

B. Producción de ARNbc de los genes de *Phaedon cochleariae*

5 Se sintetizó ARNbc en cantidades de miligramo usando el kit comercialmente disponible Sistema de ARNi T7 Ribomax™ Express. En primer lugar se generaron por separado dos moldes promotores de ARN polimerasa T7 en dirección 5' individuales en dos reacciones PCR individuales, conteniendo cada una la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor de T7.

10 Para cada uno de los genes diana, se generó el molde de T7 en sentido usando cebadores directo e inverso específicos de T7. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-PC**. La Tabla 8-PC proporciona detalles para preparar fragmentos de ARN de secuencias diana de *Phaedon cochleariae*, incluyendo secuencias cebadoras.

15 Las condiciones de las reacciones PCR fueron las siguientes: 1 minuto a 95 °C, seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 15 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 50 °C y 1 minuto a 72 °C seguido de 10 minutos a 72 °C. El molde de T7 antisentido se generó usando cebadores directos e inversos de T7 específicos en una reacción PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde anti-sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-PC**. Los productos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa y se purificaron mediante el kit de purificación PCR (kit de purificación PCR Qiaquick®) y precipitación de NaClO₄.
20 Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclaron para transcribirse y las hebras de ARN resultantes se hibridaron, se trataron con DNasa y RNasa y se purificaron con acetato de sodio, siguiendo las instrucciones del fabricante. La hebra sentido del ARNbc resultante para cada uno de los genes diana se proporciona en la **Tabla 8-PC**.

25 C. Pruebas de laboratorio para ensayar dianas de ARNbc, usando discos foliares de colza oleaginosa con respecto a actividad contra larvas de *Phaedon cochleariae*

El ejemplo proporcionado a continuación es una ejemplificación del hallazgo de que las larvas del escarabajo de la hoja de la mostaza (EHM) son susceptibles a ARNbc ingerido por vía oral correspondiente a los propios genes diana.

30 Para ensayar las diferentes muestras de ARN bicatenario contra larvas de EHM, se empleó un ensayo disco foliar usando material foliar de colza oleaginosa (*Brassica napus* variedad SW Oban; Fuente: Nick Balaam, Sw Seed Ltd., 49 North Road, Abington, Cambridge, CB1 6AS, Reino Unido) como fuente de alimentación. Los cultivos de insecto se mantuvieron en la misma variedad de colza oleaginosa en la cámara de insectos a 25 ± 2 °C y una humedad relativa del 60 ± 5 % con un fotoperiodo de 16h de luz/8h de oscuridad. Se cortaron discos de aproximadamente 1,1 cm de diámetro (o 0,95 cm²) de hojas de plantas de colza de 4 a 6 semanas de edad usando un taladro de corteza de tamaño adecuado. Se diluyeron muestras de ARN bicatenario a 0,1 µg/µl en agua Milli-Q que contenía Triton™ X-100 al 0,05 %. Se prepararon discos foliares tratados aplicando 25 µl de la solución diluida de ARNbc diana de PC001, PC003, PC005, PC010, PC014, PC016, PC027 y ARNbc de gfp de control o Triton™ X-100 0,05 % sobre la superficie foliar adaxial. Se dejaron secar los discos foliares y se colocaron individualmente en cada uno de los 24 pocillos de una multiplaca de 24 pocillos que contenían 1 ml de agar al 2 % gelificado que ayuda a evitar que el disco foliar se seque. Se colocaron dos larvas de EHM neonatas en cada pocillo de la placa, que después se cubrió con una tapa de plástico multipocillo. La placa (un tratamiento que contenía 48 insectos) se dividió en 4 replicados de 12 insectos por replicado (cada fila). La placa que contenía los insectos y los discos foliares se mantuvo en una cámara de insectos a 25 ± 2 °C y una humedad relativa del 60 ± 5 % con un fotoperiodo de 16h de luz/8h de oscuridad. Se alimentó a los insectos con discos foliares durante 2 días, tras los cuales se transfirieron a una nueva placa que contenía discos foliares recientemente tratados. A continuación, 4 días después del inicio del bioensayo, los insectos de cada replicado se recogieron y se transfirieron a una placa de Petri que contenía hojas de colza oleaginosa nuevas no tratadas. Se registraron la mortalidad larvaria y el peso promedio en los días 2, 4, 7, 9 y 11.

45 Las larvas de *P. cochleariae* alimentadas con hojas de colza oleaginosa tratadas con ARNbc diana desnudo intacto dieron como resultado aumentos significativos en las mortalidades larvarias para todas las dianas ensayadas, tal como se indica en la Figura 1(a). El ARN bicatenario ensayado para PC010 diana ocasionó una mortalidad larvaria del 100 % en el día 9 y para PC027 en el día 11. Para todas las otras dianas, se alcanzaron valores de mortalidad significativamente altos en el día 11 en comparación con el ARNbc de gfp de control, Triton™ X-100 al 0,05 % solamente hoja no tratada: (valor promedio en porcentaje ± intervalo de confianza con alfa 0,05) PC001 (94,4 ± 8,2); PC003 (86,1 ± 4,1); PC005 (83,3 ± 7,8); PC014 (63,9 ± 20,6); PC016 (75,0 ± 16,8); ARNbc de gfp (11,1 ± 8,2); Triton™ X-100 al 0,05 % (19,4 ± 10,5); hoja solamente (8,3 ± 10,5).

Los supervivientes larvarios se evaluaron basándose en su peso promedio. Para todas las dianas ensayadas, las larvas del escarabajo de la hoja de mostaza tuvieron pesos promedio significativamente reducidos después del día 4 del bioensayo; los insectos alimentados con ARNbc de gfp o Triton™ X-100 al 0,05 % solamente, se desarrollaron

normalmente, al igual que para larvas solamente con hojas (**Figura 1(b)-PC**).

D. Ensayos de laboratorio para explorar ARNbc a diferentes concentraciones usando discos foliares de colza oleaginosa con respecto a la actividad contra larvas de *Phaedon cochleariae*

5 Se aplicaron veinticinco μl de una solución de ARNbc PC010 o PC027 diana a concentraciones diez veces en serie desde 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hasta 0,1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ por vía tópica sobre el disco foliar de colza oleaginosa, tal como se ha descrito en el Ejemplo 4D anterior. Como control negativo, se administró solamente Triton™ X-100 al 0,05 % al disco foliar. Por tratamiento, se ensayaron veinticuatro larvas neonatas de escarabajo de la hoja de mostaza, con dos insectos por pocillo. Las placas se conservaron en la cámara de cría de insectos a una temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa del 60 ± 5 %, con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 horas. En el día 2, las larvas se transfirieron a una nueva placa que contenía discos foliares nuevos tratados con ARNbc. En el día 4 para PC010 diana y en el día 5 para PC027 diana, los insectos de cada replicado se transfirieron a una placa de Petri que contenía material foliar no tratado abundante. Los escarabajos se evaluaron como vivos o muertos en los días 2, 4, 7, 8, 9 y 11 para PC010 diana y 2, 5, 8, 9 y 12 para PC027 diana.

15 La alimentación con discos foliares de colza oleaginosa que contenían ARNbc desnudos intactos de las dos dianas diferentes, PC010 y PC027, a larvas de *P. cochleariae* dio como resultado altas mortalidades a concentraciones tan bajas como 1 ng de ARNbc/ μl de solución, tal como se muestra en las Figuras 2 (a) y (b). Los valores de mortalidad promedio en porcentaje \pm intervalo de confianza con alfa 0,05 para diferentes concentraciones de ARNbc para PC010 diana en el día 11, 0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: $8,3 \pm 9,4$; 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: 100; 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: $79,2 \pm 20,6$; 0,001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: $58,3 \pm 9,4$; 0,0001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: $12,5 \pm 15,6$; y para PC027 diana en el día 12, 0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: $8,3 \pm 9,4$; 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: $95,8 \pm 8,2$; 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: $95,8 \pm 8,2$; 0,001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: $83,3 \pm 13,3$; 0,0001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: $12,5 \pm 8,2$.

E. Clonación de un fragmento génico de EHM en un vector adecuado para la producción bacteriana de ARN bicatenario activo en insectos

25 A continuación hay un ejemplo de clonación de un fragmento de ADN correspondiente a una diana génica de EHM en un vector para la expresión de ARN bicatenario en un hospedador bacteriano, aunque puede usarse cualquier vector que comprenda un promotor de T7 o cualquier otro promotor para la transcripción eficaz en bacterias (referencia al documento WO0001846).

30 Las secuencias de los cebadores específicos usados para la amplificación del fragmento génico diana PC010 se proporcionan en la **Tabla 8-PC**. El molde usado era el vector pCR8/GW/TOPO® que contenía la secuencia de PC010 (SEC ID N°: 253). Los cebadores se usaron en una reacción PCR *touchdown* con las siguientes condiciones: 1 minuto a 95 °C, seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C con reducción de la temperatura de -0,5 °C por ciclo y 1 minuto a 72 °C, seguido de 15 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 50 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El fragmento PCR resultante se analizó en gel de agarosa, se purificó (Kit de extracción de gel QIAquick®), se clonó con extremos romos en vector pGNA49A linealizado con *Srf I* y se secuenció. La secuencia del producto PCR resultante corresponde a la SEC ID N°: 488 tal como se proporciona en la **Tabla 8-PC**. El vector recombinante que porta esta secuencia se denominó pGCDJ001.

F. Expresión y producción de una diana de ARN bicatenario en dos cepas de *Escherichia coli* AB301-105(DE3)

40 Se siguieron los procedimientos descritos a continuación para expresar niveles adecuados de ARN bicatenario activo en insectos de diana de insectos en bacterias. En este experimento, se usa una cepa deficiente en RNasIII, AB301-105(DE3).

Transformación de AB301-105(DE3)

45 Se añadieron trescientos ng del plásmido y se mezclaron suavemente en una alícuota de 50 μl de la cepa de *E. coli* químicamente competente enfriada en hielo AB301-105(DE3). Las células se incubaron sobre hielo durante 20 minutos antes de someterlas a un tratamiento de choque térmico de 37 °C durante 5 minutos, después de los cuales se pusieron de nuevo sobre hielo durante 5 minutos adicionales. Se añadieron cuatrocientos cincuenta μl de medio SOC a temperatura ambiente a las células y la suspensión se incubó en un agitador (250 rpm) a 37 °C durante 1 hora. Se transfirieron cien μl de la suspensión de células bacterianas a un matraz cónico de 500 ml que contenía 150 ml de caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antibiótico de carbenicilina. El cultivo se incubó en un agitador Innova 4430 (250 rpm) a 37 °C durante toda la noche (16 a 18 horas).

Inducción química de la expresión de ARN bicatenario en AB301-105(DE3)

55 La expresión de ARN bicatenario del vector recombinante pGCDJ001, en la cepa bacteriana AB301-105(DE3) fue posible ya que estaban presentes todos los componentes genéticos para expresión controlada. En presencia del inductor químico isopropiltiogalactósido, o IPTG, la polimerasa T7 dirigirá la transcripción de la secuencia diana en direcciones tanto antisentido como sentido ya que estas están flanqueadas por promotores de T7 orientados de manera opuesta.

La densidad óptica a 600 nm del cultivo bacteriano de una noche se midió usando un espectrofotómetro adecuado y se ajustó a un valor de 1 mediante la adición de caldo LB reciente. Se transfirieron cincuenta ml de este cultivo a un tubo Falcon™ de 50 ml y el cultivo se centrifugó después a 3000 g a 15 °C durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 50 ml de medio completo S reciente (medio SNC más 5 µg/ml de colesterol) suplementado con 100 µg/ml de carbenicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias se indujeron durante 2 a 4 horas a temperatura ambiente.

Tratamiento con calor de bacterias

Las bacterias se destruyeron mediante tratamiento con calor para minimizar el riesgo de contaminación de la dieta artificial en las placas de ensayo. Sin embargo, el tratamiento con calor de las bacterias que expresaban ARN bicatenario no es un requisito previo para inducir la toxicidad hacia los insectos debido a la interferencia de ARN. El cultivo bacteriano inducido se centrifugó a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se sometió a 80 °C durante 20 minutos en un baño con agua. Después del tratamiento con calor, el sedimento bacteriano se resuspendió en un volumen total de 50 ml de solución de Triton™ X-100 al 0,05 %. El tubo se almacenó a 4 °C hasta su uso posterior.

G. Pruebas de laboratorio para ensayar *Escherichia coli* que expresan dianas de ARNbc contra *Phaedon cochleariae*

Bioensayos de disco foliar

Se empleó el método de bioensayo de disco foliar para ensayar ARN bicatenario de PC010 diana producido en *Escherichia coli* (a partir de plásmido pGCDJ001) contra larvas del escarabajo de la hoja de mostaza. Se prepararon discos foliares a partir de follaje de colza oleaginosa, tal como se describe en el Ejemplo 4. En cada disco se pipetearon veinte µl de una suspensión bacteriana, con una medición de densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 600 nm. El disco foliar se colocó en un pocillo de una placa multipocillo de 24 pocillos que contenía 1 ml de agar gelificado. En cada disco foliar se añadieron dos larvas neonatas. Para cada tratamiento, se prepararon 3 replicados de 16 larvas neonatas por cada replicado. Las placas se mantuvieron en la cámara de cría de insectos a una temperatura de 25 ± 2 °C y una humedad relativa del 60 ± 5 %, con un fotoperíodo de luz:oscuridad de 16:8 horas. En el día 3 (es decir, 3 días después del comienzo del bioensayo), las larvas se transfirieron a una nueva placa que contenía discos foliares nuevos tratados (misma dosificación). El material foliar se renovó cada dos días a partir del día 5 en adelante. El bioensayo se puntuó en mortalidad y peso promedio. Los controles negativos fueron discos foliares tratados con bacterias que portaban el plásmido pGN29 (vector vacío) y solamente hoja.

Se ha mostrado un claro aumento de la mortalidad de larvas de *P. cochleariae* con el tiempo después de alimentar a los insectos con hojas de colza oleaginosa tratadas con una suspensión de cepa de *E. coli* deficiente en RNAsalIII ABC301-105(DE3) que contienen el plásmido pGCDJ001, mientras que se observó muy poca o ninguna mortalidad de insectos en el caso de bacterias con el plásmido pGN29 o control solamente con hojas (Figura 3-PC).

Bioensayos basados en plantas

Se rocían plantas completas con suspensiones de bacterias inducidas químicamente que expresan ARNbc antes de alimentar a los EHM con las plantas. Las plantas se cultivan en una cámara de crecimiento vegetal. Las plantas se cubrieron colocando una botella de plástico de 500 ml boca abajo sobre la planta con el cuello de la botella firmemente colocado en el suelo en una maceta y se recortó la base y se cubrió con una fina malla de nailon para permitir el aireamiento, reducir la condensación en su interior e impedir que se escapen los insectos. Se colocan EHM en cada planta tratada en la jaula. Las plantas se tratan con una suspensión de *E. coli* AB301-105(DE3) que portan el plásmido pGCDJ001 o el plásmido pGN29. Se aplican diferentes cantidades de bacterias a las plantas: por ejemplo 66, 22 y 7 unidades, donde una unidad se define como 10⁹ células bacterianas en 1 ml de una suspensión bacteriana a un valor de densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 600 nm. En cada caso, se rocía un volumen total de entre 1 y 10 ml sobre la planta con la ayuda de un vaporizador. Se usa una planta por tratamiento en este ensayo. Se cuenta el número de supervivientes y se registra el peso de cada superviviente.

El rociado de las plantas con una suspensión de la cepa bacteriana de *E. coli* AB301-105(DE3) que expresa ARNbc diana de pGCDJ001 da lugar a un drástico aumento en la mortalidad de los insectos en comparación con el control de pGN29. Estos experimentos demuestran que el ARN bicatenario correspondiente a una secuencia diana de gen de insecto producida en sistemas de expresión bacteriana de tipo silvestre o deficientes en RNAsalIII es tóxico para el insecto en cuanto a aumentos sustanciales en la mortalidad de los insectos y en el retraso en el crecimiento/desarrollo para los supervivientes larvarios. También está claro a partir de estos experimentos que se proporciona un ejemplo para proteger eficazmente a plantas/cultivos del daño por insectos mediante el uso de una pulverización de una formulación que consiste en bacterias que expresan ARN bicatenario correspondiente a un gen diana de insecto.

Ejemplo 5: *Epilachna varivettis* (Escarabajo del frijol mexicano)

A. Clonación de secuencias génicas parciales de *Epilachna varivettis*

Se aisló ARN intacto de alta calidad de 4 fases larvianas diferentes de *Epilachna varivettis* (escarabajo del frijol mexicano; Fuente: Thomas Dorsey, Supervising Entomologist, New Jersey Department of Agriculture, Division of Plant. Industry, Bureau of Biological Pest Control, Phillip Alampi Beneficial Insect Laboratory, PO Box 330, Trenton, Nueva Jersey 08625-0330, EE.UU.) usando reactivo TRIzol[®] siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico presente en la preparación de ARN se retiró mediante tratamiento con DNasa siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se generó usando un kit comercialmente disponible (Transcriptasa inversa SuperScript[®] III) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar secuencias de ADNc que comprendían una porción de los genes EV005, EV009, EV010, EV015 y EV016, se realizó una serie de reacciones PCR con cebadores degradados usando Amplitaq Gold[®] siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las secuencias de los cebadores degradados usados para la amplificación de cada uno de los genes se proporcionan en la **Tabla 2-EV**, que muestra genes diana de *Epilachna varivettis* que incluyen las secuencias cebadoras y las secuencias de ADNc obtenidas. Estos cebadores se usaron en respectivas reacciones PCR con las siguientes condiciones: para EV005 y EV009, 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 50 °C y 1 minuto 30 segundos a 72 °C, seguido de 7 minutos a 72 °C; para EV014, 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 53 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 7 minutos a 72 °C; para EV010 y EV016, 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 1 minuto 40 segundos a 72 °C, seguido de 7 minutos a 72 °C. Los fragmentos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa, se purificaron (Kit de extracción de gel QIAquick[®]), se clonaron en el vector pCR4/TOPO[®] y se secuenciaron. Las secuencias de los productos PCR resultantes se representan mediante las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 2-EV** y se citan como las secuencias parciales. Las secuencias de aminoácidos parciales correspondientes se representan por las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 3-EV**, en la que el inicio de la fase de lectura se indica entre paréntesis.

B. Producción de ARNbc de los genes de *Epilachna varivettis*

Se sintetizó ARNbc en cantidades de miligramo usando el kit comercialmente disponible Sistema de ARNi T7 Ribomax[™] Express. En primer lugar se generaron por separado dos moldes promotores de ARN polimerasa T7 en dirección 5' individuales en dos reacciones PCR individuales, conteniendo cada una la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor de T7.

Para cada uno de los genes diana, se generó el molde de T7 en sentido usando cebadores directo e inverso específicos de T7. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-EV**.

Las condiciones de las reacciones PCR fueron las siguientes: 1 minuto a 95 °C, seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 15 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 50 °C y 1 minuto a 72 °C seguido de 10 minutos a 72 °C. El molde de T7 antisentido se generó usando cebadores directos e inversos de T7 específicos en una reacción PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde anti-sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-EV**. Los productos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa y se purificaron mediante el kit de purificación PCR (kit de purificación PCR Qiaquick[®]) y precipitación de NaClO₄. Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclaron para transcribirse y las hebras de ARN resultantes se hibridaron, se trataron con DNasa y RNasa y se purificaron con acetato de sodio, siguiendo las instrucciones del fabricante. La hebra sentido del ARNbc resultante para cada uno de los genes diana se proporciona en la **Tabla 8-EV**.

C. Pruebas de laboratorio para ensayar dianas de ARNbc usando discos foliares de judía con respecto a actividad contra larvas de *Epilachna varivettis*

El ejemplo proporcionado a continuación es una ejemplificación del hallazgo de que las larvas del escarabajo del frijol mexicano (EFM) son susceptibles a ARNbc ingerido por vía oral correspondiente a los propios genes diana.

Para ensayar las diferentes muestras de ARN bicatenario contra larvas de EFM, se empleó un ensayo de disco foliar usando material foliar de judía verde (*Phaseolus vulgaris* variedad Montano; Fuente: Aveve NV, Bélgica) como fuente de alimentación. La misma variedad de judías se usó para mantener cultivos de insectos en la cámara de insectos 25 ± 2 °C y una humedad relativa del 60 ± 5 % con un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad. Se cortaron discos de aproximadamente 1,1 cm de diámetro (o 0,95 cm²) de hojas de plantas de judía de 1 a 2 semanas de edad usando un taladro de corteza de tamaño adecuado. Se diluyeron muestras de ARN bicatenario a 1 µg/µl en agua Milli-Q que contenía Triton[™] X-100 al 0,05 %. Se prepararon discos foliares tratados aplicando 25 µl de la solución diluida de ARNbc diana de EV005, EV010, EV015, EV016 y ARNbc de gfp de control o Triton[™] X-100 0,05 % sobre la superficie foliar adaxial. Se dejaron secar los discos foliares y se colocaron individualmente en cada uno de los 24 pocillos de una multiplaca de 24 pocillos que contenían 1 ml de agar al 2 % gelificado que ayuda a evitar que el disco foliar se seque. Se colocó una única larva de EFM neonata en cada pocillo de una placa, que después se cubrió con una tapa de plástico multipocillo. La placa se dividió en 3 replicados de 8 insectos por

replicado (fila). La placa que contenía los insectos y los discos foliares se mantuvo en una cámara de insectos a 25 ± 2 °C y una humedad relativa del 60 ± 5 % con un fotoperiodo de 16h de luz/8h de oscuridad. Los insectos se alimentaron de los discos foliares durante 2 días, después de lo cual los insectos se transfirieron a una nueva placa que contenía discos foliares recién tratados. A continuación, 4 días después del inicio del bioensayo, los insectos se transfirieron a una placa de Petri que contenía hojas de judía frescas no tratadas cada día hasta el día 10. La mortalidad de los insectos se registró el día 2 y después cada dos días.

La alimentación con hojas de judía verde que contenían ARNbc diana desnudos intactos aplicados en superficie a larvas de *E. varivestis* dio como resultado aumentos significativos de las mortalidades larvarias, tal como se indica en la Figura 1. Los ARN bicatenarios ensayados de las dianas EV010, EV015 y EV016 condujeron a un 100 % de mortalidad después de 8 días, mientras que el ARNbc de EV005 diana tardó 10 días en matar a todas las larvas. La mayoría de los insectos alimentados con discos foliares tratados que contenían ARNbc de gfp de control o solamente el tensioactivo Triton™ X-100 se mantuvieron durante todo el bioensayo (**Figura 1-EV**).

D. Pruebas de laboratorio para ensayar dianas de ARNbc usando discos foliares de judía con respecto a actividad contra adultos de *Epilachna varivestis*

El ejemplo proporcionado a continuación es una ejemplificación del hallazgo de que los adultos del escarabajo del frijol mexicano son susceptibles a ARNbc ingerido por vía oral correspondiente a los propios genes diana.

En una preparación de bioensayo similar a la de las larvas del escarabajo del frijol mexicano, se ensayaron EFM adultos frente a ARN bicatenario aplicado por vía tópica a discos foliares de judía. El ARNbc de ensayo de cada diana EV010, EV015 y EV016 se diluyó en Triton™ X-100 al 0,05 % hasta una concentración final de 0,1 µg/µl. Se trataron discos foliares de judía mediante aplicación tópica de 30 µl de la solución de ensayo a cada disco. Se dejó que los discos se secan completamente antes de colocar cada uno en un corte de agar al 2 % gelificado en cada pocillo de una placa multipocillo de 24 pocillos. Se recogieron adultos de tres días de edad de las jaulas de cultivo y no se les alimentó durante 7-8 horas antes de colocar un adulto en cada pocillo de la placa de bioensayo (por lo tanto, 24 adultos por tratamiento). Las placas se mantuvieron en la cámara de cría de insectos (en las mismas condiciones que para las larvas de EFM durante 24 horas) después de lo cual los adultos se transfirieron a una nueva placa que contenía discos foliares tratados con ARNbc nuevos. Después de 24 horas adicionales, los adultos de cada tratamiento se recogieron y se colocaron en una caja de plástico con dimensiones de 30 cm x 15 cm x 10 cm que contenían dos plantas de judía en macetas y no tratadas de 3 semanas de edad. Se evaluó la mortalidad de los insectos desde el día 4 hasta el día 11.

Los tres ARNbc diana (EV010, EV015 y EV016) ingeridos por adultos *Epilachna varivestis* dieron como resultado aumentos significativos de la mortalidad del día 4 (4 después del comienzo del bioensayo), como se muestra en la **Figura 2(a)-EV**. A partir del día 5, se observaron cambios drásticos en los patrones de alimentación entre insectos a los que se alimentó inicialmente con discos foliares de judía tratados con ARNbc diana y los que se alimentaron con discos que contenían ARNbc de gfp de control o tensioactivo Triton™ X-100. Fueron claramente visibles reducciones en el daño foliar por adultos EFM en plantas de judía no tratadas para las tres dianas en comparación con controles de ARNbc de gfp y de solamente tensioactivo, aunque a distintos niveles; los insectos alimentados con diana 15 provocaron el menor daño al follaje de la judía (**Figura 2(b)-EV**).

E. Clonación de un fragmento génico de EFM en un vector adecuado para la producción bacteriana de ARN bicatenario activo en insectos

A continuación hay un ejemplo de clonación de un fragmento de ADN correspondiente a una diana génica de EHM en un vector para la expresión de ARN bicatenario en un hospedador bacteriano, aunque puede usarse cualquier vector que comprende un promotor de T7 o cualquier otro promotor para la transcripción eficaz en bacterias (referencia al documento WO0001846).

Las secuencias de los cebadores específicos usados para la amplificación de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-EV**. El molde usado es el vector pCR8/GW/TOPO® que contiene cualquiera de las secuencias diana. Los cebadores se usan en una reacción PCR con las siguientes condiciones: 5 minutos a 98 °C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El fragmento PCR resultante se analizó en gel de agarosa, se purificó (Kit de extracción de gel QIAquick®), se clonó con extremos romos en vector pGNA49A linealizado con *Srf* I y se secuenció. La secuencia del producto PCR resultante corresponde a la secuencia respectiva tal como se proporciona en la **Tabla 8-EV**.

F. Expresión y producción de una diana de ARN bicatenario en dos cepas de *Escherichia coli*: (1) AB301-105(DE3), y, (2) BL21(DE3)

Se siguieron los procedimientos descritos a continuación para expresar niveles adecuados de ARN bicatenario activo en insectos de diana de insectos en bacterias. Se usó una cepa deficiente en RNasalll, AB301-105(DE3), en comparación con bacterias que contenían RNasalll de tipo silvestre, BL21(DE3).

Transformación de AB3091-105(DE3) y BL21(DE3)

Se añadieron trescientos ng del plásmido y se mezclaron suavemente en una alícuota de 50 µl de la cepa de *E. coli* químicamente competente enfriada en hielo AB301-105(DE3) o BL21(DE3). Las células se incubaron sobre hielo durante 20 minutos antes de someterlas a un tratamiento de choque térmico de 37 °C durante 5 minutos, después de los cuales se pusieron de nuevo sobre hielo durante 5 minutos adicionales. Se añadieron cuatrocientos cincuenta µl de medio SOC a temperatura ambiente a las células y la suspensión se incubó en un agitador (250 rpm) a 37 °C durante 1 hora. Se transfirieron cien µl de la suspensión de células bacterianas a un matraz cónico de 500 ml que contenía 150 ml de caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido suplementado con 100 µg/ml de antibiótico de carbenicilina. El cultivo se incubó en un agitador Innova 4430 (250 rpm) a 37 °C durante toda la noche (16 a 18 horas).

10 *Inducción química de la expresión de ARN bicatenario en AB301-105(DE3) y BL21(DE3)*

La expresión de ARN bicatenario a partir del vector recombinante en la cepa bacteriana AB301-105(DE3) o BL21(DE3) fue posible ya que estaban presentes todos los componentes genéticos para expresión controlada. En presencia del inductor químico isopropiltiogalactósido, o IPTG, la polimerasa T7 dirigirá la transcripción de la secuencia diana en direcciones tanto antisentido como sentido ya que estas están flanqueadas por promotores de T7 orientados de manera opuesta.

15 La densidad óptica a 600 nm del cultivo bacteriano de una noche se midió usando un espectrofotómetro adecuado y se ajustó a un valor de 1 mediante la adición de caldo LB reciente. Se transfirieron cincuenta ml de este cultivo a un tubo Falcon™ de 50 ml y el cultivo se centrifugó después a 3000 g a 15 °C durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 50 ml de medio completo S reciente (medio SNC más 5 µg/ml de colesterol) suplementado con 100 µg/ml de carbenicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias se indujeron durante 2 a 4 horas a temperatura ambiente.

Tratamiento con calor de bacterias

25 Las bacterias se destruyeron mediante tratamiento con calor para minimizar el riesgo de contaminación de la dieta artificial en las placas de ensayo. Sin embargo, el tratamiento con calor de las bacterias que expresaban ARN bicatenario no es un requisito previo para inducir la toxicidad hacia los insectos debido a la interferencia de ARN. El cultivo bacteriano inducido se centrifugó a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se sometió a 80 °C durante 20 minutos en un baño con agua. Después del tratamiento con calor, el sedimento bacteriano se resuspendió en 1,5 ml de agua MilliQ y la suspensión se transfirió a un tubo de microcentrifuga. Se prepararon y usaron diversos tubos en los bioensayos para cada renovación. Los tubos se conservaron a -20 °C hasta su uso posterior.

G. Pruebas de laboratorio para ensayar *Escherichia coli* que expresan dianas de ARNbc contra *Epilachna varivertis*

Bioensayos basados en plantas

35 Se rocían plantas completas con suspensiones de bacterias inducidas químicamente que expresan ARNbc antes de alimentar a los EFM con las plantas. Se cultivan en una cámara de cultivo de plantas. Las plantas se cubrieron colocando una botella de plástico de 500 ml boca abajo sobre la planta con el cuello de la botella firmemente colocado en el suelo en una maceta y se recortó la base y se cubrió con una fina malla de nailon para permitir el aireamiento, reducir la condensación en su interior e impedir que se escapen los insectos. Se colocan EFM en cada planta tratada en la jaula. Las plantas se tratan con una suspensión de *E. coli* AB301-105(DE3) que portan el vector recombinante o el plásmido pGN29. Se aplican diferentes cantidades de bacterias a las plantas: por ejemplo 66, 22 y 7 unidades, donde una unidad se define como 10⁹ células bacterianas en 1 ml de una suspensión bacteriana a un valor de densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 600 nm. En cada caso, se rocía un volumen total de entre 1 y 10 ml sobre la planta con la ayuda de un vaporizador. Se usa una planta por tratamiento en este ensayo. Se cuenta el número de supervivientes y se registra el peso de cada superviviente.

45 El rociado de las plantas con una suspensión de la cepa bacteriana de *E. coli* AB301-105(DE3) que expresa ARNbc diana de vector recombinante da lugar a un drástico aumento en la mortalidad de los insectos en comparación con el control de pGN29. Estos experimentos demuestran que el ARN bicatenario correspondiente a una secuencia diana de gen de insecto producida en sistemas de expresión bacteriana de tipo silvestre o deficientes en RNasIII es tóxico para el insecto en cuanto a aumentos sustanciales en la mortalidad de los insectos y en el retraso en el crecimiento/desarrollo para los supervivientes larvarios. También está claro a partir de estos experimentos que se proporciona un ejemplo para proteger eficazmente a plantas/cultivos del daño por insectos mediante el uso de una pulverización de una formulación que consiste en bacterias que expresan ARN bicatenario correspondiente a un gen diana de insecto.

Ejemplo 6: *Anthonomus grandis* (grillo de la cápsula del algodónero)

55 **A. Clonación de secuencias parciales de *Anthonomus grandis***

Se aisló ARN intacto, de alta calidad de las 3 fases de *Anthonomus grandis* (grillo de la cápsula del algodónero;

Fuente: Dr. Gary Benzon, Benzon Research Inc., 7 Kuhn Drive, Carlisle, Pennsylvania 17013, EE.UU.) usando reactivo TRIzol[®] siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico presente en la preparación de ARN se retiró mediante tratamiento con DNasa siguiendo las instrucciones del fabricante. Se generó ADNc usando un kit comercialmente disponible (transcriptasa inversa SuperScript[®] III) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 5 Para aislar secuencias de ADNc que comprendían una porción de los genes AG001, AG005, AG010, AG014 y AG016, se realizó una serie de reacciones PCR con cebadores degradados usando Amplitaq Gold[®] siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las secuencias de los cebadores degradados usados para la amplificación de cada uno de los genes se proporcionan en la **Tabla 2-AG**. Estos cebadores se usaron en respectivas reacciones PCR con las siguientes condiciones: para AG001, AG005 y AG016, 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 50 °C y 1 minuto y 30 segundos a 72 °C, seguido de 7 minutos a 72 °C; para AG010, 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 2 minutos y 30 segundos a 72 °C, seguido de 7 minutos a 72 °C; para AG014, 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 7 minutos a 72 °C. Los fragmentos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa, se purificaron (Kit de extracción de gel QIAquick[®]), se clonaron en el vector pCR8/GW/TOPO[®] y se secuenciaron. Las secuencias de los productos PCR resultantes se representan mediante las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 2-AG** y se citan como las secuencias parciales. Las secuencias de aminoácidos parciales correspondientes se representan por las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 3-AG**,

B. Producción de ARNbc de los genes de *Anthonomus grandis* (grillo de la cápsula del algodónero)

- 20 Se sintetizó ARNbc en cantidades de miligramo usando el kit comercialmente disponible Sistema de ARNi T7 Ribomax[™] Express. En primer lugar se generaron por separado dos moldes promotores de ARN polimerasa T7 en dirección 5' individuales en dos reacciones PCR individuales, conteniendo cada una la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor de T7.

Para cada uno de los genes diana, se generó el molde de T7 en sentido usando cebadores directo e inverso específicos de T7. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-AG**. Se realizó una PCR *touchdown* de la siguiente manera: 1 minuto a 95 °C, seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C con reducción de la temperatura de 0,5 °C por ciclo y 1 minuto a 72 °C, seguido de 15 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 50 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El molde de T7 antisentido se generó usando cebadores directos e inversos de T7 específicos en una reacción PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde anti-sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-AG**. Los productos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa y se purificaron mediante el kit de purificación PCR (kit de purificación PCR Qiaquick[®]) y precipitación de NaClO₄. Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclaron para transcribirse y las hebras de ARN resultantes se hibridaron, se trataron con DNasa y RNasa y se purificaron con acetato de sodio, siguiendo las instrucciones del fabricante. La hebra sentido del ARNbc resultante para cada uno de los genes diana se proporciona en la **Tabla 8-AG**.

C. Pruebas de laboratorio para ensayar dianas de ARNbc, usando dieta artificial con respecto a actividad contra las larvas del grillo de la cápsula del algodónero, *Anthonomus grandis*.

Se mantiene un cultivo de grillos de la cápsula del algodónero, *Anthonomus grandis*, con dieta artificial. Para los bioensayos, se recogen huevos de grillo de la cápsula del algodónero y se preparan tal como se ha descrito anteriormente y se colocan en una placa de Petri sobre papel de filtro húmedo. Los huevos se incuban en oscuridad a 25 ± 2 °C y una humedad relativa del 65 ± 5 % durante tres días para obtener larvas de primera fase. Estas larvas se usan en superposición de superficie de la dieta y bioensayos de incorporación para ensayar ARNbc correspondiente a genes diana de GCA AG001, AG005, AG010, AG014 y AG016.

Para el bioensayo de superposición de superficie de la dieta, se aplican por vía tópica 25 µl muestras de ARN bicatenario a una concentración de 1 µg/µl a 500 µl dieta establecida en cada pocillo. Para el bioensayo de incorporación en la dieta, se mezclan 50 µl de ARNbc (1 µg/µl) con 500 µl dieta establecida (a una temperatura aproximada de 45 °C). En ambos bioensayos, las placas se dejan secar en una cabina de flujo laminar horizontal. Se transfieren larvas de grillos de la cápsula del algodónero L1 a la dieta con un insecto por pocillo. Se ensayan cuarenta y ocho insectos en total para cada uno de los tratamientos.

Se realizan evaluaciones a intervalos diarios hasta el día 7 (7 días después del inicio del bioensayo). En cada evaluación los insectos se evalúan como vivos o muertos y se examinan en busca de anomalías. Durante la prueba las condiciones de ensayo son 25 ± 2 °C y una humedad relativa del 65 ± 5 %, con un fotoperiodo de 14:10 horas de luz:oscuridad.

D. Clonación de un fragmento génico de GCA en un vector adecuado para la producción bacteriana de ARN bicatenario activo en insectos

A continuación hay un ejemplo de clonación de un fragmento de ADN correspondiente a una diana génica de GCA en un vector para la expresión de ARN bicatenario en un hospedador bacteriano, aunque puede usarse cualquier

vector que comprende un promotor de T7 o cualquier otro promotor para la transcripción eficaz en bacterias (referencia al documento WO0001846).

Las secuencias de los cebadores específicos usados para la amplificación de los genes diana se proporcionan en la Tabla 8-AG. El molde usado es el vector pCR8/GW/TOPO[®] que contiene cualquiera de las secuencias diana. Los cebadores se usan en una reacción PCR con las siguientes condiciones: 5 minutos a 98 °C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El fragmento PCR resultante se analizó en gel de agarosa, se purificó (Kit de extracción de gel QIAquick[®]), se clonó con extremos romos en vector pGNA49A linealizado con *Srf* I y se secuenció. La secuencia del producto PCR resultante corresponde a la secuencia respectiva tal como se proporciona en la Tabla 8.

10 **E. Expresión y producción de una diana de ARN bicatenario en dos cepas de *Escherichia coli*: (1) AB301-105(DE3), y, (2) BL21(DE3)**

Se siguieron los procedimientos descritos a continuación para expresar niveles adecuados de ARN bicatenario activo en insectos de diana de insectos en bacterias. Se usó una cepa deficiente en RNasall, AB301-105(DE3), en comparación con bacterias que contenían RNasall de tipo silvestre, BL21(DE3).

15 *Transformación de AB301-105(DE3) y BL21(DE3)*

Se añadieron trescientos ng del plásmido y se mezclaron suavemente en una alícuota de 50 µl de la cepa de *E. coli* químicamente competente enfriada en hielo AB301-105(DE3) o BL21(DE3). Las células se incubaron sobre hielo durante 20 minutos antes de someterlas a un tratamiento de choque térmico de 37 °C durante 5 minutos, después de los cuales se pusieron de nuevo sobre hielo durante 5 minutos adicionales. Se añadieron cuatrocientos cincuenta µl de medio SOC a temperatura ambiente a las células y la suspensión se incubó en un agitador (250 rpm) a 37 °C durante 1 hora. Se transfirieron cien µl de la suspensión de células bacterianas a un matraz cónico de 500 ml que contenía 150 ml de caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido suplementado con 100 µg/ml de antibiótico de carbenicilina. El cultivo se incubó en un agitador Innova 4430 (250 rpm) a 37 °C durante toda la noche (16 a 18 horas).

25 *Inducción química de la expresión de ARN bicatenario en AB301-105(DE3) y BL21(DE3)*

La expresión de ARN bicatenario a partir del vector recombinante en la cepa bacteriana AB301-105(DE3) o BL21(DE3) fue posible ya que estaban presentes todos los componentes genéticos para expresión controlada. En presencia del inductor químico isopropiltiogalactósido, o IPTG, la polimerasa T7 dirigirá la transcripción de la secuencia diana en direcciones tanto antisentido como sentido ya que estas están flanqueadas por promotores de T7 orientados de manera opuesta.

La densidad óptica a 600 nm del cultivo bacteriano de una noche se midió usando un espectrofotómetro adecuado y se ajustó a un valor de 1 mediante la adición de caldo LB reciente. Se transfirieron cincuenta ml de este cultivo a un tubo Falcon[™] de 50 ml y el cultivo se centrifugó después a 3000 g a 15 °C durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 50 ml de medio completo S reciente (medio SNC más 5 µg/ml de colesterol) suplementado con 100 µg/ml de carbenicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias se indujeron durante 2 a 4 horas a temperatura ambiente.

Tratamiento con calor de bacterias

Las bacterias se destruyeron mediante tratamiento con calor para minimizar el riesgo de contaminación de la dieta artificial en las placas de ensayo. Sin embargo, el tratamiento con calor de las bacterias que expresaban ARN bicatenario no es un requisito previo para inducir la toxicidad hacia los insectos debido a la interferencia de ARN. El cultivo bacteriano inducido se centrifugó a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se sometió a 80 °C durante 20 minutos en un baño con agua. Después del tratamiento con calor, el sedimento bacteriano se resuspendió en 1,5 ml de agua MilliQ y la suspensión se transfirió a un tubo de microcentrífuga. Se prepararon y usaron diversos tubos en los bioensayos para cada renovación. Los tubos se conservaron a -20 °C hasta su uso posterior.

F. Pruebas de laboratorio para ensayar *Escherichia coli* que expresan dianas de ARNbc contra *Anthonomus grandis*

Bioensayos basados en plantas

Se rocían plantas completas con suspensiones de bacterias inducidas químicamente que expresan ARNbc antes de alimentar a los GCA con las plantas. Se cultivan en una cámara de cultivo de plantas. Las plantas se cubrieron colocando una botella de plástico de 500 ml boca abajo sobre la planta con el cuello de la botella firmemente colocado en el suelo en una maceta y se recortó la base y se cubrió con una fina malla de nailon para permitir el aireamiento, reducir la condensación en su interior e impedir que se escapen los insectos. Se colocan GCA en cada planta tratada en la jaula. Las plantas se tratan con una suspensión de *E. coli* AB301-105(DE3) que portan el vector recombinante o el plásmido pGN29. Se aplican diferentes cantidades de bacterias a las plantas: por ejemplo 66, 22

y 7 unidades, donde una unidad se define como 10^9 células bacterianas en 1 ml de una suspensión bacteriana a un valor de densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 600 nm. En cada caso, se rocía un volumen total de entre 1 y 10 ml sobre la planta con la ayuda de un vaporizador. Se usa una planta por tratamiento en este ensayo. Se cuenta el número de supervivientes y se registra el peso de cada superviviente.

- 5 El rociado de las plantas con una suspensión de la cepa bacteriana de *E. coli* AB301-105(DE3) que expresa ARNbc diana de vector recombinante da lugar a un drástico aumento en la mortalidad de los insectos en comparación con el control de pGN29. Estos experimentos demuestran que el ARN bicatenario correspondiente a una secuencia diana de gen de insecto producida en sistemas de expresión bacteriana de tipo silvestre o deficientes en RNasaIII es tóxico para el insecto en cuanto a aumentos sustanciales en la mortalidad de los insectos y en el retraso en el crecimiento/desarrollo para los supervivientes larvarios. También está claro a partir de estos experimentos que se proporciona un ejemplo para proteger eficazmente a plantas/cultivos del daño por insectos mediante el uso de una pulverización de una formulación que consiste en bacterias que expresan ARN bicatenario correspondiente a un gen diana de insecto.

Ejemplo 7: *Tribolium castaneum* (escarabajo rojo de la harina)

15 A. Clonación de secuencias parciales de *Tribolium castaneum*

Se aisló ARN intacto de alta calidad de todos los estadios diferentes de *Tribolium castaneum* (escarabajo rojo de la harina; Fuente: Dr. Lara Senior, Insect Investigations Ltd., Capital Business Park, Wentloog, Cardiff, CF3 2PX, Gales, Reino Unido) usando reactivo TRIzol[®] siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico presente en la preparación de ARN se retiró mediante tratamiento con DNasa siguiendo las instrucciones del fabricante. Se generó ADNc usando un kit comercialmente disponible (transcriptasa inversa SuperScript[®] III) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar secuencias de ADNc que comprendían una porción de los genes TC001, TC002, TC010, TC014 y TC015, se realizó una serie de reacciones PCR con cebadores degradados usando Ampliqaq Gold[®] siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 25 Las secuencias de los cebadores degradados usados para la amplificación de cada uno de los genes se proporcionan en la **Tabla 2-TC**. Estos cebadores se usaron en respectivas reacciones PCR con las siguientes condiciones: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 50°C y 1 minuto y 30 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72 °C (TC001, TC014, TC015); 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 2 minutos y 30 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72 °C (TC010); 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 53 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 7 minutos a 72 °C (TC002). Los fragmentos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa, se purificaron (Kit de extracción de gel QIAquick[®]), se clonaron en el vector pCR8/GW/TOPO[®] y se secuenciaron. Las secuencias de los productos PCR resultantes se representan mediante las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 2-TC** y se citan como las secuencias parciales. Las secuencias de aminoácidos parciales correspondientes se representan por las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 3-TC**.

B. Producción de ARNbc de los genes de *Tribolium castaneum*

Se sintetizó ARNbc en cantidades de miligramo usando el kit comercialmente disponible Sistema de ARNi T7 Ribomax[™] Express. En primer lugar se generaron por separado dos moldes promotores de ARN polimerasa T7 en dirección 5' individuales en dos reacciones PCR individuales, conteniendo cada una la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor de T7.

Para cada uno de los genes diana, se generó el molde de T7 en sentido usando cebadores directo e inverso específicos de T7. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-TC**. Las condiciones de las reacciones PCR fueron las siguientes: 1 minuto a 95 °C, seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C (-0,5 °C/ciclo) y 1 minuto a 72 °C, seguido de 15 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 50 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El molde de T7 antisentido se generó usando cebadores directos e inversos de T7 específicos en una reacción PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde anti-sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-TC**. Los productos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa y se purificaron mediante el kit de purificación PCR (kit de purificación PCR Qiaquick[®]) y precipitación de NaClO₄. Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclaron para transcribirse y las hebras de ARN resultantes se hibridaron, se trataron con DNasa y RNasa y se purificaron con acetato de sodio, siguiendo las instrucciones del fabricante. La hebra sentido del ARNbc resultante para cada uno de los genes diana se proporciona en la **Tabla 8-TC**.

55 C. Pruebas de laboratorio para ensayar dianas de ARNbc, usando dieta artificial para actividad contra larvas de *Tribolium castaneum*

El ejemplo proporcionado a continuación es una ejemplificación del hallazgo de que las larvas del escarabajo rojo de la harina (ERH) son susceptibles a ARNbc ingerido por vía oral correspondiente a los propios genes diana.

Se mantuvieron escarabajos rojos de la harina, *Tribolium castaneum*, en Insect Investigations Ltd. (origen: Imperial College of Science, Technology and Medicine, Silwood Park, Berkshire, Reino Unido). Los insectos se cultivaron de acuerdo con SOP/251/01 de la compañía. En resumen, los escarabajos se alojaron en jarras o tanques de plástico. Estos tienen una parte superior abierta para permitir la ventilación. Se ajustó una pieza de malla sobre la parte superior y se fija con una banda elástica para evitar la fuga. Se colocó medio de cría de larvas (harina) en el recipiente en el que pueden criarse los escarabajos. Las colonias de escarabajos producidas almacenadas se mantuvieron en una habitación a temperatura controlada a 25 ± 3 °C con un ciclo de luz:oscuridad de 16:8 horas.

Se incorporó ARN bicatenario de TC014 diana (con la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 799) a una mezcla de harina y leche en polvo (harina integral: leche en polvo a una relación de 4:1) y se dejó secar durante toda la noche. Cada replicado se preparó por separado: Se añadieron 100 µl de una solución de ARNbc 10 µg/µl (1 mg de ARNbc) a una mezcla de 0,1 g harina/leche. Se molió la mezcla seca en un polvo fino. Los insectos se mantuvieron dentro de placas de Petri (diámetro de 55 mm), revestido con una doble capa de papel de filtro. La dieta tratada se colocó entre las dos capas de papel de filtro. Se colocaron diez larvas de primera fase de ambos sexos en cada placa (replicado). Se realizaron cuatro replicados para cada tratamiento. El control fue agua Milli-Q. Se realizaron evaluaciones (número de supervivientes) de manera regular. Durante la prueba, las condiciones de ensayo fueron de 25 - 33 °C y una humedad relativa del 20 - 25 %, con un fotoperiodo de 12:12 horas de luz:oscuridad.

La supervivencia de larvas de *T. castaneum* a lo largo del tiempo con dieta artificial tratada con ARNbc TC014 diana se redujo significativamente en comparación con el control solamente con dieta, tal como se muestra en la Figura 1.

D. Clonación de un fragmento génico de ERH en un vector adecuado para la producción bacteriana de ARN bicatenario activo en insectos

A continuación hay un ejemplo de clonación de un fragmento de ADN correspondiente a una diana génica de ERH en un vector para la expresión de ARN bicatenario en un hospedador bacteriano, aunque puede usarse cualquier vector que comprende un promotor de T7 o cualquier otro promotor para la transcripción eficaz en bacterias (referencia al documento WO0001846).

Las secuencias de los cebadores específicos usados para la amplificación de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-TC**. El molde usado es el vector pCR8/GW/TOPO[®] que contiene cualquiera de las secuencias diana. Los cebadores se usan en una reacción PCR con las siguientes condiciones: 5 minutos a 98 °C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El fragmento PCR resultante se analizó en gel de agarosa, se purificó (Kit de extracción de gel QIAquick[®]), se clonó con extremos romos en vector pGNA49A linealizado con *Srf* I y se secuenció. La secuencia del producto PCR resultante corresponde a la secuencia respectiva tal como se proporciona en la **Tabla 8-TC**.

E. Expresión y producción de una diana de ARN bicatenario en dos cepas de *Escherichia coli*: (1) AB301-105(DE3), y, (2) BL21(DE3)

Se siguieron los procedimientos descritos a continuación para expresar niveles adecuados de ARN bicatenario activo en insectos de diana de insectos en bacterias. Se usó una cepa deficiente en RNasalll, AB301-105(DE3), en comparación con bacterias que contenían RNasalll de tipo silvestre, BL21(DE3).

Transformación de AB301-105(DE3) y BL21(DE3)

Se añadieron trescientos ng del plásmido y se mezclaron suavemente en una alícuota de 50 µl de la cepa de *E. coli* químicamente competente enfriada en hielo AB301-105(DE3) o BL21(DE3). Las células se incubaron sobre hielo durante 20 minutos antes de someterlas a un tratamiento de choque térmico de 37 °C durante 5 minutos, después de los cuales se pusieron de nuevo sobre hielo durante 5 minutos adicionales. Se añadieron cuatrocientos cincuenta µl de medio SOC a temperatura ambiente a las células y la suspensión se incubó en un agitador (250 rpm) a 37 °C durante 1 hora. Se transfirieron cien µl de la suspensión de células bacterianas a un matraz cónico de 500 ml que contenía 150 ml de caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido suplementado con 100 µg/ml de antibiótico de carbenicilina. El cultivo se incubó en un agitador Innova 4430 (250 rpm) a 37 °C durante toda la noche (16 a 18 horas).

Inducción química de la expresión de ARN bicatenario en AB301-105(DE3) y BL21(DE3)

La expresión de ARN bicatenario a partir del vector recombinante en la cepa bacteriana AB301-105(DE3) o BL21(DE3) fue posible ya que estaban presentes todos los componentes genéticos para expresión controlada. En presencia del inductor químico isopropiltiogalactósido, o IPTG, la polimerasa T7 dirigirá la transcripción de la secuencia diana en direcciones tanto antisentido como sentido ya que estas están flanqueadas por promotores de T7 orientados de manera opuesta.

La densidad óptica a 600 nm del cultivo bacteriano de una noche se midió usando un espectrofotómetro adecuado y se ajustó a un valor de 1 mediante la adición de caldo LB reciente. Se transfirieron cincuenta ml de este cultivo a un tubo Falcon[™] de 50 ml y el cultivo se centrifugó después a 3000 g a 15 °C durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 50 ml de medio completo S reciente (medio SNC más 5

µg/ml de colesterol) suplementado con 100 µg/ml de carbenicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias se indujeron durante 2 a 4 horas a temperatura ambiente.

Tratamiento con calor de bacterias

5 Las bacterias se destruyeron mediante tratamiento con calor para minimizar el riesgo de contaminación de la dieta artificial en las placas de ensayo. Sin embargo, el tratamiento con calor de las bacterias que expresaban ARN bicatenario no es un requisito previo para inducir la toxicidad hacia los insectos debido a la interferencia de ARN. El cultivo bacteriano inducido se centrifugó a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se sometió a 80 °C durante 20 minutos en un baño con agua. Después del tratamiento con calor, el sedimento bacteriano se resuspendió en 1,5 ml de agua MilliQ y la suspensión se transfirió a un tubo de microcentrifuga. Se prepararon y usaron diversos tubos en los bioensayos para cada renovación. Los tubos se conservaron a -20 °C hasta su uso posterior.

F. Pruebas de laboratorio para ensayar *Escherichia coli* que expresan dianas de ARNbc contra *Tribolium castaneum*

Bioensayos basados en plantas

15 Se rocían plantas completas con suspensiones de bacterias inducidas químicamente que expresan ARNbc antes de alimentar a los ERH con las plantas. Se cultivan en una cámara de cultivo de plantas. Las plantas se cubrieron colocando una botella de plástico de 500 ml boca abajo sobre la planta con el cuello de la botella firmemente colocado en el suelo en una maceta y se recortó la base y se cubrió con una fina malla de nailon para permitir el aireamiento, reducir la condensación en su interior e impedir que se escapen los insectos. Se colocan ERH en cada planta tratada en la jaula. Las plantas se tratan con una suspensión de *E. coli* AB301-105(DE3) que portan el vector recombinante o el plásmido pGN29. Se aplican diferentes cantidades de bacterias a las plantas: por ejemplo 66, 22 y 7 unidades, donde una unidad se define como 10⁹ células bacterianas en 1 ml de una suspensión bacteriana a un valor de densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 600 nm. En cada caso, se rocía un volumen total de entre 1 y 10 ml sobre la planta con la ayuda de un vaporizador. Se usa una planta por tratamiento en este ensayo. Se cuenta el número de supervivientes y se registra el peso de cada superviviente.

20 El rociado de las plantas con una suspensión de la cepa bacteriana de *E. coli* AB301-105(DE3) que expresa ARNbc diana de vector recombinante da lugar a un drástico aumento en la mortalidad de los insectos en comparación con el control de pGN29. Estos experimentos demuestran que el ARN bicatenario correspondiente a una secuencia diana de gen de insecto producida en sistemas de expresión bacteriana de tipo silvestre o deficientes en RNasIII es tóxico para el insecto en cuanto a aumentos sustanciales en la mortalidad de los insectos y en el retraso en el crecimiento/desarrollo para los supervivientes larvarios. También está claro a partir de estos experimentos que se proporciona un ejemplo para proteger eficazmente a plantas/cultivos del daño por insectos mediante el uso de una pulverización de una formulación que consiste en bacterias que expresan ARN bicatenario correspondiente a un gen diana de insecto.

35 Ejemplo 8: *Myzus persicae* (pulgón verde del melocotón)

A. Clonación de secuencias parciales de *Myzus persicae*

Se aisló ARN intacto, de alta calidad de ninfas de *Myzus persicae* (pulgón verde del melocotón; Fuente: Dr. Rachel Down, Insect & Pathogen Interactions, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, YO41 1LZ, Reino Unido) usando reactivo TRIzol[®] siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico presente en la preparación de ARN se retiró mediante tratamiento con DNasa siguiendo las instrucciones del fabricante. Se generó ADNc usando un kit comercialmente disponible (transcriptasa inversa SuperScript[®] III) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar secuencias de ADNc que comprendían una porción de los genes MP001, MP002, MP010, MP016 y MP027, se realizó una serie de reacciones PCR con cebadores degradados usando Amplitaq Gold[®] siguiendo las instrucciones del fabricante.

45 Las secuencias de los cebadores degradados usados para la amplificación de cada uno de los genes se proporcionan en la **Tabla 2-MP**. Estos cebadores se usaron en respectivas reacciones PCR con las siguientes condiciones: para MP001, MP002 y MP016, 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 50 °C y 1 minuto 30 segundos a 72 °C, seguido de 7 minutos a 72 °C; para MP027, se usó un programa de *touchdown*: 10 minutos a 95 °C, seguido de 10 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 40 segundos a 60 °C con reducción de la temperatura de 1 °C por ciclo y 1 minuto 10 segundos a 72 °C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 40 segundos a 50 °C y 1 minuto 10 segundos a 72 °C, seguido de 7 minutos a 72 °C; para MP010, 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 3 minutos a 72 °C, seguido de 7 minutos a 72 °C. Los fragmentos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa, se purificaron (Kit de extracción de gel QIAquick[®]), se clonaron en el vector pCR8/GW/TOPO[®] y se secuenciaron. Las secuencias de los productos PCR resultantes se representan mediante las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 2-MP** y se citan como las secuencias parciales. Las secuencias de aminoácidos parciales correspondientes se representan por las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 3-MP**,

B. Producción de ARNbc de genes de *Myzus persicae*

Se sintetizó ARNbc en cantidades de miligramo usando el kit comercialmente disponible Sistema de ARNi T7 Ribomax™ Express. En primer lugar se generaron por separado dos moldes promotores de ARN polimerasa T7 en dirección 5' individuales en dos reacciones PCR individuales, conteniendo cada una la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor de T7.

Para cada uno de los genes diana, se generó el molde de T7 en sentido usando cebadores directo e inverso específicos de T7. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-MP**. Se realizó una PCR *touchdown* de la siguiente manera: 1 minuto a 95 °C, seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C (para MP001, MP002, MP016, MP027 y gfp) o 30 segundos a 50 °C (para MP010) con una reducción de la temperatura de 0,5 °C por ciclo y 1 minuto a 72 °C, seguido de 15 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 45 °C y 1 minuto a 72 °C seguido de 10 minutos a 72 °C. El molde de T7 antisentido se generó usando cebadores directos e inversos de T7 específicos en una reacción PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde anti-sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-MP**. Los productos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa y se purificaron mediante el kit de purificación PCR (kit de purificación PCR Qiaquick®) y precipitación de NaClO₄. Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclaron para transcribirse y las hebras de ARN resultantes se hibridaron, se trataron con DNasa y RNasa y se purificaron con acetato de sodio, siguiendo las instrucciones del fabricante. La hebra sentido del ARNbc resultante para cada uno de los genes diana se proporciona en la **Tabla 8-MP**.

C. Pruebas de laboratorio para ensayar dianas de ARNbc usando dieta artificial líquida con respecto a actividad contra *Myzus persicae*

Se preparó dieta artificial líquida para el pulgón verde del melocotón, *Myzus persicae*, basándose en la dieta adecuada para pulgones del guisante (*Acyrtosiphon pisum*), tal como se describe por Febvay et al. (1988) [Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). Can. J. Zool. 66: 2449-2453], pero con algunas modificaciones. El componente de aminoácidos de la dieta se preparó de la siguiente manera: en mg/100 ml, alanina 178,71, beta-alanina 6,22, arginina 244,9, asparagina 298,55, ácido aspártico 88,25, cisteína 29,59, ácido glutámico 149,36, glutamina 445,61, glicina 166,56, histidina 136,02, isoleucina 164,75, leucina 231,56, clorhidrato de lisina 351,09, metionina 72,35, ornitina (HCl) 9,41, fenilalanina 293, prolina 129,33, serina 124,28, treonina 127,16, triptófano 42,75, tirosina 38,63, L-valina 190,85. Los aminoácidos se disolvieron en 30 ml de H₂O Milli-Q excepto para tirosina que se disolvió primero en unas pocas gotas de HCl 1 M antes de añadirla a la mezcla de aminoácidos. El componente de mezcla de vitaminas de la dieta se preparó como una reserva concentrada 5x de la siguiente manera: en mg/l, ácido aminobenzoico 100, ácido ascórbico 1000, biotina 1, pantotenato de calcio 50, cloruro de colina 500, ácido fólico 10, mioinositol 420, ácido nicotínico 100, clorhidrato de piridoxina 25, riboflavina 5, clorhidrato de tiamina 25. La riboflavina se disolvió en 1 ml de H₂O a 50 °C y después se añadió a la reserva de mezcla de vitaminas. La mezcla de vitaminas se separó en alícuotas en 20 ml por alícuota y se almacenó a -20 °C. Se añadió una alícuota de mezcla de vitaminas a la solución de aminoácidos. Se añadió sacarosa y MgSO₄·7H₂O con las siguientes cantidades a la mezcla: 20 g y 242 mg, respectivamente. Se preparó una solución de reserva de metales traza de la siguiente manera: en mg/100 ml, CuSO₄·5H₂O 4,7, FeCl₃·6H₂O 44,5, MnCl₂·4H₂O 6,5, NaCl 25,4, ZnCl₂ 8,3. Se añadieron diez ml de la solución de metales traza y 250 mg de KH₂PO₄ a la dieta y se añadió agua Milli-Q a un volumen final de dieta líquida de 100 ml. El pH de la dieta se ajustó a 7 con una solución de KOH 1 M. La dieta se esterilizó por filtración a través de un disco de filtro de 0,22 µm (Millipore).

Se criaron pulgones verdes del melocotón (*Myzus persicae*; Fuente: Dr. Rachel Down, Insect & Pathogen Interactions, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, YO41 1LZ, Reino Unido) sobre colza oleaginosa de 4 a 6 semanas de edad (*Brassica napus* variedad SW Oban; Fuente: Nick Balaam, Sw Seed Ltd., 49 North Road, Abington, Cambridge, CB1 6AS, Reino Unido) en jaulas con marco de aluminio que contenían una malla de 70 µm en una cámara de ambiente controlado con las siguientes condiciones: 23 ± 2 °C y humedad relativa del 60 ± 5 %, con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 horas.

Un día antes del inicio del bioensayo, se recogieron adultos de las jaulas de cría y se colocaron en hojas de colza nuevas separadas en una placa de Petri y se dejaron durante toda la noche en la cámara de insectos. Al día siguiente se seleccionaron ninfas de primera fase y se transfirieron a cámaras de alimentación. Una cámara de alimentación comprendía 10 ninfas de primera fase colocadas en una paca de Petri pequeña (con un diámetro de 3 cm) cubierta con una única capa de parafilm M muy estirado sobre el que se añadieron 50 µl de la dieta. La cámara se selló con una segunda capa de parafilm y se incubó en las mismas condiciones que los cultivos de adultos. La dieta con ARNbc se renovó cada dos días y se evaluó la supervivencia de los insectos en el día 8, es decir, al 8º día después del comienzo del bioensayo. Por tratamiento, se prepararon simultáneamente 5 cámaras de alimentación de bioensayos (replicados). Se incorporaron soluciones de ARNbc de ensayo y de control (gfp) en la dieta hasta una concentración final de 2 µg/µl. Las cámaras de alimentación se mantuvieron a 23 ± 2 °C y una humedad relativa del 60 ± 5 %, con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Se determinó un ensayo de Mann-Whitney mediante GraphPad Prism versión 4 para establecer si las medianas diferían significativamente entre la diana 27 (MP027) y ARNbc de gfp.

En el bioensayo, la alimentación con dieta artificial líquida suplementada con ARNbc desnudo intacto de la diana 27 (SEC ID N°: 1061) a ninfas de *Myzus persicae* usando una cámara de alimentación, dio como resultado un aumento significativo de la mortalidad, tal como se muestra en la Figura 1. El porcentaje medio de supervivientes para la diana 27, ARNbc de gfp y tratamiento solamente con dieta fue de 2, 34 y 82, respectivamente. La comparación de la diana 027 con grupos de ARNbc usando el ensayo de Mann-Whitney dio como resultado un valor de P de una cola de 0,004 que indica que la mediana de la diana 027 es significativamente diferente ($P < 0,05$) de la mediana mayor esperada de ARNbc de gfp. Los pulgones verdes del melocotón con la dieta líquida con ARNbc de diana 27 incorporado fueron notablemente más pequeños que aquellos que se alimentaron con dieta solamente o con ARNbc de gfp de control (datos no presentados).

10 **D. Clonación de un fragmento génico de PVM en un vector adecuado para la producción bacteriana de ARN bicatenario activo en insectos**

A continuación hay un ejemplo de clonación de un fragmento de ADN correspondiente a una diana génica de PVM en un vector para la expresión de ARN bicatenario en un hospedador bacteriano, aunque puede usarse cualquier vector que comprende un promotor de T7 o cualquier otro promotor para la transcripción eficaz en bacterias (referencia al documento WO0001846).

Las secuencias de los cebadores específicos usados para la amplificación de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-MP**. El molde usado es el vector pCR8/GW/TOPO[®] que contiene cualquiera de las secuencias diana. Los cebadores se usan en una reacción PCR con las siguientes condiciones: 5 minutos a 98 °C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El fragmento PCR resultante se analizó en gel de agarosa, se purificó (Kit de extracción de gel QIAquick[®]), se clonó en su extremo romo en vector pGNA49A linealizado con *Srf I* y se secuenció. La secuencia del producto PCR resultante corresponde a la secuencia respectiva tal como se proporciona en la **Tabla 8-MP**.

25 **E. Expresión y producción de una diana de ARN bicatenario en dos cepas de *Escherichia coli*: (1) AB301-105(DE3), y, (2) BL21(DE3)**

Se siguieron los procedimientos descritos a continuación para expresar niveles adecuados de ARN bicatenario activo en insectos de diana de insectos en bacterias. Se usó una cepa deficiente en RNasalll, AB301-105(DE3), en comparación con bacterias que contenían RNasalll de tipo silvestre, BL21(DE3).

Transformación de AB301-105(DE3) y BL21(DE3)

Se añadieron trescientos ng del plásmido y se mezclaron suavemente en una alícuota de 50 µl de la cepa de *E. coli* químicamente competente enfriada en hielo AB301-105(DE3) o BL21(DE3). Las células se incubaron sobre hielo durante 20 minutos antes de someterlas a un tratamiento de choque térmico de 37 °C durante 5 minutos, después de los cuales se pusieron de nuevo sobre hielo durante 5 minutos adicionales. Se añadieron cuatrocientos cincuenta µl de medio SOC a temperatura ambiente a las células y la suspensión se incubó en un agitador (250 rpm) a 37 °C durante 1 hora. Se transfirieron cien µl de la suspensión de células bacterianas a un matraz cónico de 500 ml que contenía 150 ml de caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido suplementado con 100 µg/ml de antibiótico de carbenicilina. El cultivo se incubó en un agitador Innova 4430 (250 rpm) a 37 °C durante toda la noche (16 a 18 horas).

Inducción química de la expresión de ARN bicatenario en AB301-105(DE3) y BL21(DE3)

La expresión de ARN bicatenario a partir del vector recombinante en la cepa bacteriana AB301-105(DE3) o BL21(DE3) fue posible ya que estaban presentes todos los componentes genéticos para expresión controlada. En presencia del inductor químico isopropiltiogalactósido, o IPTG, la polimerasa T7 dirigirá la transcripción de la secuencia diana en direcciones tanto antisentido como sentido ya que estas están flanqueadas por promotores de T7 orientados de manera opuesta.

La densidad óptica a 600 nm del cultivo bacteriano de una noche se midió usando un espectrofotómetro adecuado y se ajustó a un valor de 1 mediante la adición de caldo LB reciente. Se transfirieron cincuenta ml de este cultivo a un tubo Falcon[™] de 50 ml y el cultivo se centrifugó después a 3000 g a 15 °C durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 50 ml de medio completo S reciente (medio SNC más 5 µg/ml de colesterol) suplementado con 100 µg/ml de carbenicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias se indujeron durante 2 a 4 horas a temperatura ambiente.

50 *Tratamiento con calor de bacterias*

Las bacterias se destruyeron mediante tratamiento con calor para minimizar el riesgo de contaminación de la dieta artificial en las placas de ensayo. Sin embargo, el tratamiento con calor de las bacterias que expresaban ARN bicatenario no es un requisito previo para inducir la toxicidad hacia los insectos debido a la interferencia de ARN. El cultivo bacteriano inducido se centrifugó a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se sometió a 80 °C durante 20 minutos en un baño con agua. Después del tratamiento con calor, el sedimento bacteriano se resuspendió en 1,5 ml de agua MilliQ y la suspensión se transfirió a un tubo de

microcentrífuga. Se prepararon y usaron diversos tubos en los bioensayos para cada renovación. Los tubos se conservaron a -20 °C hasta su uso posterior.

F. Pruebas de laboratorio para ensayar *Escherichia coli* que expresan dianas de ARNbc contra *Myzus persicae*

5 *Bioensayos basados en plantas*

Se rocían plantas completas con suspensiones de bacterias inducidas químicamente que expresan ARNbc antes de alimentar a los PVM con las plantas. Se cultivan en una cámara de cultivo de plantas. Las plantas se cubrieron colocando una botella de plástico de 500 ml boca abajo sobre la planta con el cuello de la botella firmemente colocado en el suelo en una maceta y se recortó la base y se cubrió con una fina malla de nailon para permitir el aireamiento, reducir la condensación en su interior e impedir que se escapen los insectos. Se colocan PVM en cada planta tratada en la jaula. Las plantas se tratan con una suspensión de *E. coli* AB301-105(DE3) que portan el vector recombinante o el plásmido pGN29. Se aplican diferentes cantidades de bacterias a las plantas: por ejemplo 66, 22 y 7 unidades, donde una unidad se define como 10^9 células bacterianas en 1 ml de una suspensión bacteriana a un valor de densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 600 nm. En cada caso, se rocía un volumen total de entre 1 y 10 ml sobre la planta con la ayuda de un vaporizador. Se usa una planta por tratamiento en este ensayo. Se cuenta el número de supervivientes y se registra el peso de cada superviviente.

El rociado de las plantas con una suspensión de la cepa bacteriana de *E. coli* AB301-105(DE3) que expresa ARNbc diana de vector recombinante da lugar a un drástico aumento en la mortalidad de los insectos en comparación con el control de pGN29. Estos experimentos demuestran que el ARN bicatenario correspondiente a una secuencia diana de gen de insecto producida en sistemas de expresión bacteriana de tipo silvestre o deficientes en RNasaIII es tóxico para el insecto en cuanto a aumentos sustanciales en la mortalidad de los insectos y en el retraso en el crecimiento/desarrollo para los supervivientes larvarios. También está claro a partir de estos experimentos que se proporciona un ejemplo para proteger eficazmente a plantas/cultivos del daño por insectos mediante el uso de una pulverización de una formulación que consiste en bacterias que expresan ARN bicatenario correspondiente a un gen diana de insecto.

Ejemplo 9: *Nilaparvata lugens* (saltamontes marrón)

A. Clonación de secuencias parciales de *Nilaparvata lugens*

A partir de ARN total de alta calidad de *Nilaparvata lugens* (fuente: Dr. J. A. Gatehouse, Dept. Biological Sciences, Durham University, Reino Unido) se generó ADNc usando un kit comercialmente disponible (Transcriptasa inversa SuperScript® III) siguiendo el protocolo del fabricante.

Para aislar secuencias de ADNc que comprendían una porción de los genes de *Nilaparvata lugens* NL001, NL002, NL003, NL004, NL005, NL006, NL007, NL008, NL009, NL010, NL011, NL012, NL013, NL014, NL015, NL016, NL018, NL019, NL021, NL022 y NL027, se realizó una serie de reacciones PCR con cebadores degradados usando Amplitaq Gold® siguiendo el protocolo del fabricante.

Las secuencias de los cebadores degradados usados para la amplificación de cada uno de los genes se proporcionan en la **Tabla 2-NL**. Estos cebadores se usaron en respectivas reacciones PCR con las siguientes condiciones: para NL001, 5 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL002: 3 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL003: 3 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 61 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL004: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 51 °C y 1 minuto a 72 °C; para NL005: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL006: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 3 minutos a 30 segundos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL007: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 1 minuto a 15 segundos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL008: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 53 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL009: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL010: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 2 minutos a 30 segundos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL011: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C; para NL012: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C; para NL013: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 1 minuto a 10 segundos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL014: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 53 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL015: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 1 minuto a 40 segundos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL016: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 1 minuto a 40 segundos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL018: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 1 minuto a 35 segundos a 72 °C, seguido de 10

minutos a 72 °C; para NL019: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL021: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 1 minuto 45 segundos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL022: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 1 minuto 45 segundos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; y para NL027: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 1 minuto 45 segundos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. Los fragmentos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa, se purificaron (Kit de extracción de gel QIAquick®), se clonaron en el vector pCR8/GW/TOPO® y se secuenciaron. Las secuencias de los productos PCR resultantes se representan mediante las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 2-NL** y se citan como las secuencias parciales. Las secuencias de aminoácidos parciales correspondientes se representan por las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 3-NL**,

B. Clonación de una secuencia parcial del gen NL023 de *Nilaparvata lugens* mediante secuencia de EST

A partir de ARN total de alta calidad de *Nilaparvata lugens* (fuente: Dr. J. A. Gatehouse, Dept. Biological Sciences, Durham University, Reino Unido) se generó ADNc usando un kit comercialmente disponible (Transcriptasa inversa SuperScript® III) siguiendo el protocolo del fabricante.

Se amplificó una secuencia parcial de ADNc, NL023, a partir de ADNc de *Nilaparvata lugens* que correspondía a una secuencia de EST de *Nilaparvata lugens* en la base de datos pública Genbank con el número de referencia CAH65679.2. Para aislar secuencias de ADNc que comprendían una porción del gen NL023, se realizó una serie de reacciones PCR con cebadores específicos basados en EST usando PerfectShot™ ExTaq (N° de Cat. RR005A, Takara Bio Inc.) siguiendo el protocolo del fabricante.

Para NL023, se usaron los cebadores específicos oGBKW002 y oGBKW003 (representados en el presente documento como SEC ID N°: 1157 y SEC ID N°: 1158, respectivamente) en dos reacciones PCR independientes con las siguientes condiciones: 3 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 56 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. Los productos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa, se purificaron (Kit de extracción de gel QIAquick®), se clonaron en el vector pCR4-TOPO® y se secuenciaron. La secuencia consenso resultante de la secuencia de ambos productos de PCR se representa en el presente documento por SEC ID N°: 1111 y se cita como secuencia parcial del gen NL023. La secuencia parcial de aminoácidos correspondiente se representa en el presente documento como SEC ID N°: 1112.

C. Producción de ARNbc de genes de *Nilaparvata lugens*

Se sintetizó ARNbc en cantidades de miligramo usando el kit comercialmente disponible Sistema de ARNi T7 Ribomax™ Express. En primer lugar se generaron por separado dos moldes promotores de ARN polimerasa T7 en dirección 5' individuales en dos reacciones PCR individuales, conteniendo cada una la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor de T7.

Para cada uno de los genes diana, se generó el molde de T7 en sentido usando cebadores directo e inverso específicos de T7. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la Tabla 4. Las condiciones de las reacciones PCR fueron las siguientes: para NL001: 4 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL002: 4 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL003: 4 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 66 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL004: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 54 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL005: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 57 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL006: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 54 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL007: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 51 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL008: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 54 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL009: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 54 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL010: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 54 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL011: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 53 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL012: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 53 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL013: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL014: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 51 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL015: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL016: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 57 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL018: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL019: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 54 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para

NL021: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL022: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 53 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; para NL023: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 52 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C; y para NL027: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 52 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El molde de T7 antisentido se generó usando cebadores directos e inversos de T7 específicos en una reacción PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde anti-sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 4-NL**. Los productos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa y se purificaron mediante el kit de purificación PCR (kit de purificación PCR Qiaquick®). Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclaron para transcribirse y las hebras de ARN resultantes se hibridaron, se trataron con DNasa y RNasa y se purificaron con acetato de sodio, siguiendo las instrucciones del fabricante, pero con la siguiente modificación: El sedimento de ARN se lava dos veces en etanol al 70 %. La hebra sentido del ARNbc resultante para cada uno de los genes diana se proporciona en la **Tabla 8-NL**.

El ADN molde usado para las reacciones PCR con cebadores de T7 en el control de proteína verde fluorescente (gfp) fue el plásmido pPD96.12 (the Fire Lab, <http://genome-www.stanford.edu/group/fire/>), que contiene la secuencia codificante de *gfp* de tipo silvestre intercalada por 3 intrones sintéticos. Se sintetizó ARN bicatenario usando el kit comercialmente disponible Sistema de ARNi T7 Ribomax™ Express. En primer lugar se generaron por separado dos moldes promotores de ARN polimerasa T7 en dirección 5' individuales en dos reacciones PCR individuales, conteniendo cada una la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor de T7. Para *gfp*, se generó el molde de T7 sentido usando el cebador directo específico de T7 oGAU183 y el cebador inverso específico oGAU182 (representados en el presente documento como SEC ID N°: 236 y SEC ID N°: 237, respectivamente) en una reacción PCR con las siguientes condiciones: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El molde de T7 antisentido se generó usando el cebador directo específico oGAU181 y el cebador inverso específico de T7 oGAU184 (representados en el presente documento como SEC ID N°: 238 y SEC ID N°: 239, respectivamente) en una reacción PCR con las mismas condiciones descritas anteriormente. Los productos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa y se purificaron (kit de purificación PCR QIAquick®). Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclaron para transcribirse y las hebras de ARN resultantes se hibridaron, se trataron con DNasa y RNasa y se purificaron mediante precipitación con acetato de sodio e isopropanol, siguiendo el protocolo del fabricante, pero con la siguiente modificación: El sedimento de ARN se lava dos veces en etanol al 70 %. Las hebras sentido del ARNbc resultantes se representa en el presente documento por SEC ID N°: 235.

D. Pruebas de laboratorio para explorar dianas de ARNbc usando dieta artificial líquida con respecto a actividad contra *Nilaparvata lugens*

Se preparó dieta artificial líquida (MMD-1) para el saltamontes marrón del arroz, *Nilaparvata lugens*, tal como se describe por Koyama (1988) [Artificial rearing and nutritional physiology of the planthoppers and leafhoppers (Homoptera: Delphacidae and Deltoccephalidae) on a holidic diet. JARQ 22: 20-27], pero con una modificación en la concentración final del componente de la dieta, sacarosa: se usó un 14,4 % (peso frente a volumen). Se prepararon componentes de la dieta como concentrados separados: reserva mineral 10x (almacenada a 4 °C), reserva de aminoácidos 2x (almacenada a -20 °C) y reserva de vitaminas x 10 (almacenada a -20 °C). Los componentes de reserva se mezclaron inmediatamente antes del inicio de un bioensayo a concentración de 4/3x para permitir la dilución con la solución de ARNbc de ensayo (concentración 4x), el pH se ajustó a 6,5 y se esterilizó por filtración en alícuotas de aproximadamente 500 µl.

Se criaron saltamontes marrones del arroz (*Nilaparvata lugens*) en plantas de arroz de dos a tres meses de edad (*Oryza sativa* cv Taichung Native 1) en una cámara de ambiente controlado: 27 ± 2 °C, humedad relativa del 80 %, con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Una cámara de alimentación comprendía 10 ninfas de primera o segunda fase colocadas en una placa de Petri pequeña (con un diámetro de 3 cm) cubierta con una única capa de parafilm M muy estirado a la que se añadieron 50 µl de la dieta. La cámara se selló con una segunda capa de parafilm y se incubó en las mismas condiciones que los cultivos de adultos pero sin exposición directa a la luz. La dieta con ARNbc se renovó cada dos días y se evaluó la supervivencia de los insectos diariamente. Por tratamiento, se prepararon simultáneamente 5 cámaras de alimentación de bioensayos (replicados). Se incorporaron soluciones de ARNbc de ensayo y de control (*gfp*) en la dieta hasta una concentración final de 2 mg/ml. Las cámaras de alimentación se mantuvieron a 27 ± 2 °C, humedad relativa del 80 %, con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Se analizaron los datos de supervivencia de insectos usando el modelo de curva de supervivencia de Kaplan-Meier y se compararon las supervivencias entre grupos usando el ensayo de rangos logarítmicos (Prism versión 4.0).

La alimentación con dieta artificial líquida suplementada con ARNbc desnudos intactos a *Nilaparvata lugens in vitro* usando una cámara de alimentación dio como resultado aumentos significativos de las mortalidades de las ninfas tal como se muestra en cuatro bioensayos separados (**Figuras 1(a)-(d)-NL; Tablas 1a-d-NL**). Estos resultados demuestran que los ARNbc correspondientes a diferentes genes esenciales de SM mostraron toxicidad significativa hacia el saltamontes marrón del arroz.

El efecto del ARNbc de gfp en la supervivencia de SM en estos bioensayos no es significativamente diferente a la supervivencia solamente con dieta.

Las **Tablas 10a-d-NL** muestran un resumen de la supervivencia de *Nilaparvata lugens* con dieta artificial suplementada con 2 mg/ml (concentración final) de las siguientes dianas: en la **Tabla 10(a)-NL**: NL002, NL003, NL005, NL010; en la **Tabla 10(b)-NL** NL009, NL016; en la **Tabla 10(c)-NL** NL014, NL018; y en la **Tabla 10(d)-NL** NL013, NL015, NL021. En la columna de análisis de supervivencia, el efecto del ARNi se indica de la siguiente manera: + = supervivencia significativamente reducida en comparación con el control de ARNbc de gfp (alfa < 0,05); - = sin diferencias significativas en la supervivencia en comparación con el control de ARNbc de gfp. Se compararon las curvas de supervivencia (entre dieta solamente y la dieta complementada con ARNbc de ensayo, ARNbc de gfp y ARNbc de ensayo y dieta solamente y ARNbc de gfp) usando el ensayo de rangos logarítmicos.

E. Pruebas de laboratorio para explorar ARNbc a diferentes concentraciones usando dieta artificial con respecto a actividad contra *Nilaparvata lugens*

Se aplicaron cincuenta µl de dieta artificial líquida suplementada con diferentes concentraciones de ARNbc de NL002 diana, concretamente 1, 0,2, 0,08 y 0,04 mg/ml (concentración final), a las cámaras de alimentación de saltamontes marrón. La dieta con ARNbc se renovó cada dos días y se evaluó la supervivencia de los insectos diariamente. Por tratamiento, se prepararon simultáneamente 5 cámaras de alimentación de bioensayos (replicados). Las cámaras de alimentación se mantuvieron a 27 ± 2 °C, humedad relativa del 80 %, con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Se analizaron los datos de supervivencia de insectos usando el modelo de curva de supervivencia de Kaplan-Meier y se compararon las supervivencias entre grupos usando el ensayo de rangos logarítmicos (Prism versión 4.0).

La alimentación con dieta artificial líquida suplementada con ARNbc desnudos intactos NL002 diana a diferentes concentraciones dio como resultado mortalidades de SM significativamente mayores a concentraciones finales tan bajas como 0,04 mg de ARNbc por ml de dieta en comparación con la supervivencia solamente con dieta, tal como se muestra en la **Figura 2-NL** y en la **Tabla 9-NL**. La **Tabla 9-NL** resume la supervivencia de *Nilaparvata lugens* en un ensayo de alimentación con dieta artificial suplementado con 1, 0,2, 0,08 y 0,04 mg/ml (concentración final) de NL002 diana. En la columna de análisis de supervivencia se indica el efecto del ARNi de la siguiente manera: + = reduce significativamente la supervivencia en comparación con control solamente con dieta (alfa < 0,05); - = sin diferencias significativas en la supervivencia en comparación con el control solamente con dieta. Las curvas de supervivencia se compararon usando el ensayo de rangos logarítmicos.

F. Clonación de un fragmento génico de SM en un vector adecuado para la producción bacteriana de ARN bicatenario activo en insectos

A continuación hay un ejemplo de clonación de un fragmento de ADN correspondiente a una diana génica de SM en un vector para la expresión de ARN bicatenario en un hospedador bacteriano, aunque puede usarse cualquier vector que comprende un promotor de T7 o cualquier otro promotor para la transcripción eficaz en bacterias (referencia al documento WO0001846).

Las secuencias de los cebadores específicos usados para la amplificación de los genes diana se proporcionan en la Tabla 8. El molde usado es el vector pCR8/GW/TOPO[®] que contiene cualquiera de las secuencias diana. Los cebadores se usan en una reacción PCR con las siguientes condiciones: 5 minutos a 98 °C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El fragmento PCR resultante se analizó en gel de agarosa, se purificó (Kit de extracción de gel QIAquick[®]), se clonó con extremos romos en vector pGNA49A linealizado con *Srf* I y se secuenció. La secuencia del producto PCR resultante corresponde a la secuencia respectiva tal como se proporciona en la **Tabla 8-NL**.

G. Expresión y producción de una diana de ARN bicatenario en dos cepas de *Escherichia coli*: (1) AB301-105(DE3), y, (2) BL21(DE3)

Se siguieron los procedimientos descritos a continuación para expresar niveles adecuados de ARN bicatenario activo en insectos de diana de insectos en bacterias. Se usó una cepa deficiente en RNasalll, AB301-105(DE3), en comparación con bacterias que contenían RNasalll de tipo silvestre, BL21(DE3).

Transformación de AB301-105(DE3) y BL21(DE3)

Se añadieron trescientos ng del plásmido y se mezclaron suavemente en una alícuota de 50 µl de la cepa de *E. coli* químicamente competente enfriada en hielo AB301-105(DE3) o BL21(DE3). Las células se incubaron sobre hielo durante 20 minutos antes de someterlas a un tratamiento de choque térmico de 37 °C durante 5 minutos, después de los cuales se pusieron de nuevo sobre hielo durante 5 minutos adicionales. Se añadieron cuatrocientos cincuenta µl de medio SOC a temperatura ambiente a las células y la suspensión se incubó en un agitador (250 rpm) a 37 °C durante 1 hora. Se transfirieron cien µl de la suspensión de células bacterianas a un matraz cónico de 500 ml que contenía 150 ml de caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido suplementado con 100 µg/ml de antibiótico de carbenicilina. El cultivo se incubó en un agitador Innova 4430 (250 rpm) a 37 °C durante toda la noche (16 a 18 horas).

Inducción química de la expresión de ARN bicatenario en AB301-105(DE3) y BL21(DE3)

La expresión de ARN bicatenario a partir del vector recombinante en la cepa bacteriana AB301-105(DE3) o BL21(DE3) fue posible ya que estaban presentes todos los componentes genéticos para expresión controlada. En presencia del inductor químico isopropiltiogalactósido, o IPTG, la polimerasa T7 dirigirá la transcripción de la secuencia diana en direcciones tanto antisentido como sentido ya que estas están flanqueadas por promotores de T7 orientados de manera opuesta.

La densidad óptica a 600 nm del cultivo bacteriano de una noche se midió usando un espectrofotómetro adecuado y se ajustó a un valor de 1 mediante la adición de caldo LB reciente. Se transfirieron cincuenta ml de este cultivo a un tubo Falcon™ de 50 ml y el cultivo se centrifugó después a 3000 g a 15 °C durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 50 ml de medio completo S reciente (medio SNC más 5 µg/ml de colesterol) suplementado con 100 µg/ml de carbenicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias se indujeron durante 2 a 4 horas a temperatura ambiente.

Tratamiento con calor de bacterias

Las bacterias se destruyeron mediante tratamiento con calor para minimizar el riesgo de contaminación de la dieta artificial en las placas de ensayo. Sin embargo, el tratamiento con calor de las bacterias que expresaban ARN bicatenario no es un requisito previo para inducir la toxicidad hacia los insectos debido a la interferencia de ARN. El cultivo bacteriano inducido se centrifugó a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se sometió a 80 °C durante 20 minutos en un baño con agua. Después del tratamiento con calor, el sedimento bacteriano se resuspendió en 1,5 ml de agua MilliQ y la suspensión se transfirió a un tubo de microcentrifuga. Se prepararon y usaron diversos tubos en los bioensayos para cada renovación. Los tubos se conservaron a -20 °C hasta su uso posterior.

H. Pruebas de laboratorio para ensayar *Escherichia coli* que expresan dianas de ARNbc contra *Nilaparvata lugens**Bioensayos basados en plantas*

Se rocían plantas completas con suspensiones de bacterias inducidas químicamente que expresan ARNbc antes de alimentar a los SM con las plantas. Se cultivan en una cámara de cultivo de plantas. Las plantas se cubrieron colocando una botella de plástico de 500 ml boca abajo sobre la planta con el cuello de la botella firmemente colocado en el suelo en una maceta y se recortó la base y se cubrió con una fina malla de nailon para permitir el aireamiento, reducir la condensación en su interior e impedir que se escapen los insectos. Se colocan SM en cada planta tratada en la jaula. Las plantas se tratan con una suspensión de *E. coli* AB301-105(DE3) que portan el vector recombinante o el plásmido pGN29. Se aplican diferentes cantidades de bacterias a las plantas: por ejemplo 66, 22 y 7 unidades, donde una unidad se define como 10⁹ células bacterianas en 1 ml de una suspensión bacteriana a un valor de densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 600 nm. En cada caso, se rocía un volumen total de entre 1 y 10 ml sobre la planta con la ayuda de un vaporizador. Se usa una planta por tratamiento en este ensayo. Se cuenta el número de supervivientes y se registra el peso de cada superviviente.

El rociado de las plantas con una suspensión de la cepa bacteriana de *E. coli* AB301-105(DE3) que expresa ARNbc diana de vector recombinante da lugar a un drástico aumento en la mortalidad de los insectos en comparación con el control de pGN29. Estos experimentos demuestran que el ARN bicatenario correspondiente a una secuencia diana de gen de insecto producida en sistemas de expresión bacteriana de tipo silvestre o deficientes en RNasall es tóxico para el insecto en cuanto a aumentos sustanciales en la mortalidad de los insectos y en el retraso en el crecimiento/desarrollo para los supervivientes larvarios. También está claro a partir de estos experimentos que se proporciona un ejemplo para proteger eficazmente a plantas/cultivos del daño por insectos mediante el uso de una pulverización de una formulación que consiste en bacterias que expresan ARN bicatenario correspondiente a un gen diana de insecto.

45 Ejemplo 10: *Chilos suppressalis* (barrenador rayado del tallo del arroz).**A. Clonación de la secuencia parcial de los genes de *Chilo suppressalis* mediante PCR familiar**

Se aisló ARN intacto, de alta calidad de los 4 estadios larvarios diferentes de *Chilo suppressalis* (barrenador rayado del tallo del arroz) usando reactivo TRIzol® siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico presente en la preparación de ARN se retiró mediante tratamiento con DNasa siguiendo las instrucciones del fabricante. Se generó ADNc usando un kit comercialmente disponible (transcriptasa inversa SuperScript® III) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar secuencias de ADNc que comprendían una porción de los genes CS001, CS002, CS003, CS006, CS007, CS009, CS011, CS013, CS014, CS015, CS016 y CS018, se realizó una serie de reacciones PCR con cebadores degradados usando Amplitaq Gold® siguiendo las instrucciones del fabricante.

55 Las secuencias de los cebadores degradados usados para la amplificación de cada uno de los genes se

proporcionan en la **Tabla 2-CS**. Estos cebadores se usaron en respectivas reacciones PCR con las siguientes condiciones: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. Los fragmentos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa, se purificaron (Kit de extracción de gel QIAquick®), se clonaron en el vector pCR4/TOPO® y se secuenciaron. Las secuencias de los productos PCR resultantes se representan mediante las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 2-CS** y se citan como las secuencias parciales. Las secuencias de aminoácidos parciales correspondientes se representan por las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 3-CS**.

B. Producción de ARNbc de los genes de *Chilo suppressalis*

Se sintetizó ARNbc en cantidades de miligramo usando el kit comercialmente disponible Sistema de ARNi T7 Ribomax™ Express. En primer lugar se generaron por separado dos moldes promotores de ARN polimerasa T7 en dirección 5' individuales en dos reacciones PCR individuales, conteniendo cada una la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor de T7.

Para cada uno de los genes diana, se generó el molde de T7 en sentido usando cebadores directo e inverso específicos de T7. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-CS**. Las condiciones de las reacciones PCR fueron las siguientes: 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El molde de T7 antisentido se generó usando cebadores directos e inversos de T7 específicos en una reacción PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde anti-sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-CS**. Los productos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa y se purificaron mediante el kit de purificación PCR (kit de purificación PCR Qiaquick®) y precipitación de NaClO₄. Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclaron para transcribirse y las hebras de ARN resultantes se hibridaron, se trataron con DNasa y RNasa y se purificaron con acetato de sodio, siguiendo las instrucciones del fabricante. La hebra sentido del ARNbc resultante para cada uno de los genes diana se proporciona en la **Tabla 8-CS**.

C. Pruebas de laboratorio para ensayar dianas de ARNbc, usando dieta artificial para actividad contra larvas de *Chilo suppressalis*

Se mantuvieron barrenadores rayados del tallo del arroz, *Chilo suppressalis*, (origen: Syngenta, Stein, Suiza) con una dieta artificial modificada basada en la descrita por Kamano y Sato, 1985 (en: Handbook of Insect Rearing, volúmenes I y II. P Singh y RF Moore, eds., Elsevier Science Publishers, Amsterdam y Nueva York, 1985, págs. 448). En resumen, se preparó un litro de dieta de la siguiente manera: se añadieron 20 g de agar a 980 ml de agua Milli-Q y se esterilizó por autoclave; la solución de agar se enfrió a aproximadamente 55 °C y los demás ingredientes se añadieron y se mezclaron exhaustivamente: 40 g de harina de maíz (Polenta), 20 g de celulosa, 30 g de sacarosa, 30 g de caseína, 20 g de germen de trigo (tostado), 8 g mezcla de sales de Wesson, 12 g de mezcla de vitaminas de Vanderzant, 1,8 g de ácido sórbico, 1,6 g de nipagina (metilparabeno), 0,3 g de aureomicina, 0,4 g de colesterol y 0,6 g de L-cisteína. La dieta se enfrió a aproximadamente 45 °C y se vertió en bandejas o vasos de alimentación. La dieta se dejó reposar en una cabina de flujo laminar horizontal. Se retiraron secciones de hojas de arroz con huevos ovipositados de una jaula que alojaba polillas adultas y se clavaron en la dieta sólida en el vaso o bandeja de cría. Se dejó que los huevos eclosionaran y las larvas disponibles estaban disponibles para bioensayos y el mantenimiento de los cultivos de insectos. Durante las pruebas y la cría, las condiciones fueron de 28 ± 2 °C y una humedad relativa del 80 ± 5 %, con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 horas.

Se usó la misma dieta artificial para los bioensayos pero en este caso la dieta se vertió a partes iguales en 24 placas multipocillo, conteniendo cada pocillo 1 ml de dieta. Una vez que se establece la dieta, las formulaciones de ensayo se aplican a la superficie de la dieta (2 cm²), a la tasa de 50 µl de ARNbc de diana a 1 µg/µl. Las soluciones de ARNbc se dejan secar y se colocan dos larvas de polillas de primera fase en cada pocillo. Después de 7 días, las larvas se transfieren a dieta tratada reciente en placas multipocillo. En el día 14 (es decir, 14 días después del inicio del bioensayo) se registra el número de insectos vivos y muertos y se examinan en busca de anomalías. Se ensayan veinticuatro larvas en total por tratamiento.

Se realiza un bioensayo alternativo en el que se alimentan larvas neonatas del barrenador rayado del tallo del arroz con hojas de arroz tratadas. Se sumergen secciones pequeñas de hojas de arroz *Indica* de la variedad Taichung native 1 en solución de Triton™ X-100 al 0,05 % que contiene 1 µg/µl de ARNbc diana, se deja secar y cada sección se coloca en un pocillo de una de 24 multipocillos que contienen agar gelificado al 2 %. Se transfieren dos neonatos de la bandeja de cría a cada sección de hoja tratada con ARNbc (24 larvas por tratamiento). Después de 4 y 8 días, las larvas se transfieren a secciones de hojas de arroz tratadas recientes. El número de larvas vivas y muertas se evalúa los días 4, 8 y 12; también se registra cualquier anomalía.

D. Clonación de un fragmento génico de BRA en un vector adecuado para la producción bacteriana de ARN bicatenario activo en insectos

A continuación hay un ejemplo de clonación de un fragmento de ADN correspondiente a una diana génica de BRA en un vector para la expresión de ARN bicatenario en un hospedador bacteriano, aunque puede usarse cualquier

vector que comprende un promotor de T7 o cualquier otro promotor para la transcripción eficaz en bacterias (referencia al documento WO0001846).

Las secuencias de los cebadores específicos usados para la amplificación de los genes diana se proporcionan en la Tabla 8. El molde usado es el vector pCR8/GW/TOPO[®] que contiene cualquiera de las secuencias diana. Los cebadores se usan en una reacción PCR con las siguientes condiciones: 5 minutos a 98 °C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El fragmento PCR resultante se analizó en gel de agarosa, se purificó (Kit de extracción de gel QIAquick[®]), se clonó con extremos romos en vector pGNA49A linealizado con *Srf* I y se secuenció. La secuencia del producto PCR resultante corresponde a la secuencia respectiva tal como se proporciona en la **Tabla 8-CS**.

10 **E. Expresión y producción de una diana de ARN bicatenario en dos cepas de *Escherichia coli*: (1) AB301-105(DE3), y, (2) BL21(DE3)**

Se siguieron los procedimientos descritos a continuación para expresar niveles adecuados de ARN bicatenario activo en insectos de diana de insectos en bacterias. Se usó una cepa deficiente en RNasall, AB301-105(DE3), en comparación con bacterias que contenían RNasall de tipo silvestre, BL21(DE3).

15 *Transformación de AB301-105(DE3) y BL21(DE3)*

Se añadieron trescientos ng del plásmido y se mezclaron suavemente en una alícuota de 50 µl de la cepa de *E. coli* químicamente competente enfriada en hielo AB301-105(DE3) o BL21(DE3). Las células se incubaron sobre hielo durante 20 minutos antes de someterlas a un tratamiento de choque térmico de 37 °C durante 5 minutos, después de los cuales se pusieron de nuevo sobre hielo durante 5 minutos adicionales. Se añadieron cuatrocientos cincuenta µl de medio SOC a temperatura ambiente a las células y la suspensión se incubó en un agitador (250 rpm) a 37 °C durante 1 hora. Se transfirieron cien µl de la suspensión de células bacterianas a un matraz cónico de 500 ml que contenía 150 ml de caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido suplementado con 100 µg/ml de antibiótico de carbenicilina. El cultivo se incubó en un agitador Innova 4430 (250 rpm) a 37 °C durante toda la noche (16 a 18 horas).

25 *Inducción química de la expresión de ARN bicatenario en AB301-105(DE3) y BL21(DE3)*

La expresión de ARN bicatenario a partir del vector recombinante en la cepa bacteriana AB301-105(DE3) o BL21(DE3) fue posible ya que estaban presentes todos los componentes genéticos para expresión controlada. En presencia del inductor químico isopropiltiogalactósido, o IPTG, la polimerasa T7 dirigirá la transcripción de la secuencia diana en direcciones tanto antisentido como sentido ya que estas están flanqueadas por promotores de T7 orientados de manera opuesta.

La densidad óptica a 600 nm del cultivo bacteriano de una noche se midió usando un espectrofotómetro adecuado y se ajustó a un valor de 1 mediante la adición de caldo LB reciente. Se transfirieron cincuenta ml de este cultivo a un tubo Falcon[™] de 50 ml y el cultivo se centrifugó después a 3000 g a 15 °C durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 50 ml de medio completo S reciente (medio SNC más 5 µg/ml de colesterol) suplementado con 100 µg/ml de carbenicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias se indujeron durante 2 a 4 horas a temperatura ambiente.

Tratamiento con calor de bacterias

Las bacterias se destruyeron mediante tratamiento con calor para minimizar el riesgo de contaminación de la dieta artificial en las placas de ensayo. Sin embargo, el tratamiento con calor de las bacterias que expresaban ARN bicatenario no es un requisito previo para inducir la toxicidad hacia los insectos debido a la interferencia de ARN. El cultivo bacteriano inducido se centrifugó a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se sometió a 80 °C durante 20 minutos en un baño con agua. Después del tratamiento con calor, el sedimento bacteriano se resuspendió en 1,5 ml de agua MilliQ y la suspensión se transfirió a un tubo de microcentrífuga. Se prepararon y usaron diversos tubos en los bioensayos para cada renovación. Los tubos se conservaron a -20 °C hasta su uso posterior.

F. Pruebas de laboratorio para ensayar *Escherichia coli* que expresan dianas de ARNbc contra *Chilo suppressalis*

Bioensayos basados en plantas

Se rocían plantas completas con suspensiones de bacterias inducidas químicamente que expresan ARNbc antes de alimentar a los BRA con las plantas. Se cultivan en una cámara de cultivo de plantas. Las plantas se cubrieron colocando una botella de plástico de 500 ml boca abajo sobre la planta con el cuello de la botella firmemente colocado en el suelo en una maceta y se recortó la base y se cubrió con una fina malla de nailon para permitir el aireamiento, reducir la condensación en su interior e impedir que se escapen los insectos. Se colocan BRA en cada planta tratada en la jaula. Las plantas se tratan con una suspensión de *E. coli* AB301-105(DE3) que portan el vector recombinante o el plásmido pGN29. Se aplican diferentes cantidades de bacterias a las plantas: por ejemplo 66, 22

y 7 unidades, donde una unidad se define como 10^9 células bacterianas en 1 ml de una suspensión bacteriana a un valor de densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 600 nm. En cada caso, se rocía un volumen total de entre 1 y 10 ml sobre la planta con la ayuda de un vaporizador. Se usa una planta por tratamiento en este ensayo. Se cuenta el número de supervivientes y se registra el peso de cada superviviente.

- 5 El rociado de las plantas con una suspensión de la cepa bacteriana de *E. coli* AB301-105(DE3) que expresa ARNbc diana de vector recombinante da lugar a un drástico aumento en la mortalidad de los insectos en comparación con el control de pGN29. Estos experimentos demuestran que el ARN bicatenario correspondiente a una secuencia diana de gen de insecto producida en sistemas de expresión bacteriana de tipo silvestre o deficientes en RNasaIII es tóxico para el insecto en cuanto a aumentos sustanciales en la mortalidad de los insectos y en el retraso en el crecimiento/desarrollo para los supervivientes larvarios. También está claro a partir de estos experimentos que se proporciona un ejemplo para proteger eficazmente a plantas/cultivos del daño por insectos mediante el uso de una pulverización de una formulación que consiste en bacterias que expresan ARN bicatenario correspondiente a un gen diana de insecto.

Ejemplo 11: *Plutella xylostella* (palomilla de dorso diamante)

15 A. Clonación de una secuencia parcial de la *Plutella xylostella*

Se aisló ARN intacto, de alta calidad de todos los estadios larvarios diferentes de *Plutella xylostella* (palomilla de dorso diamante; Fuente: Dr. Lara Senior, Insect Investigations Ltd., Capital Business Park, Wentloog, Cardiff, CF3 2PX, Gales, Reino Unido) usando reactivo TRIzol[®] siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico presente en la preparación de ARN se retiró mediante tratamiento con DNasa siguiendo las instrucciones del fabricante. Se generó ADNc usando un kit comercialmente disponible (transcriptasa inversa SuperScript[®] III) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar secuencias de ADNc que comprendían una porción de los genes PX001, PX009, PX010, PX015, PX016, se realizó una serie de reacciones PCR con cebadores degradados usando Ampliqaq Gold[®] siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 25 Las secuencias de los cebadores degradados usados para la amplificación de cada uno de los genes se proporcionan en la **Tabla 2-PX**. Estos cebadores se usaron en respectivas reacciones PCR con las siguientes condiciones: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 50°C y 1 minuto y 30 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72 °C (para PX001, PX009, PX015, PX016); 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 54 °C y 2 minutos y 30 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72 °C (para PX010). Los fragmentos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa, se purificaron (Kit de extracción de gel QIAquick[®]), se clonaron en el vector pCR8/GW/TOPO[®] y se secuenciaron. Las secuencias de los productos PCR resultantes se representan mediante las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 2-PX** y se citan como las secuencias parciales. Las secuencias de aminoácidos parciales correspondientes se representan por las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 3-PX**.

35 B. Producción de ARNbc de los genes de *Plutella xylostella*

Se sintetizó ARNbc en cantidades de miligramo usando el kit comercialmente disponible Sistema de ARNi T7 Ribomax[™] Express. En primer lugar se generaron por separado dos moldes promotores de ARN polimerasa T7 en dirección 5' individuales en dos reacciones PCR individuales, conteniendo cada una la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor de T7.

- 40 Para cada uno de los genes diana, se generó el molde de T7 en sentido usando cebadores directo e inverso específicos de T7. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-PX**. Las condiciones de las reacciones PCR fueron las siguientes: 1 minuto a 95 °C, seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C (-0,5 °C/ciclo) y 1 minuto a 72 °C, seguido de 15 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 50 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El molde de T7 antisentido se generó usando cebadores directos e inversos de T7 específicos en una reacción PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde anti-sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-PX**. Los productos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa y se purificaron mediante el kit de purificación PCR (kit de purificación PCR Qiaquick[®]) y precipitación de NaClO₄. Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclaron para transcribirse y las hebras de ARN resultantes se hibridaron, se trataron con DNasa y RNasa y se purificaron con acetato de sodio, siguiendo las instrucciones del fabricante. La hebra sentido del ARNbc resultante para cada uno de los genes diana se proporciona en la **Tabla 8-PX**.

C. Pruebas de laboratorio para ensayar dianas de ARNbc, usando dieta artificial para actividad contra larvas de *Plutella xylostella*

- 55 Se mantuvieron palomillas de dorso diamante, *Plutella xylostella*, en Insect Investigations Ltd. (origen: Newcastle University, Newcastle-upon-Tyne, Reino Unido). Los insectos se criaron en hojas de repollo. Se seleccionaron larvas de ambos sexos, de primera fase (de aproximadamente 1 día de edad) para su uso en el ensayo. Los insectos se

mantuvieron en tubos Eppendorf (1,5 ml de capacidad). Se colocó dieta de palomilla de dorso diamante comercialmente disponible (Bio-Serv, NJ, EE.UU), preparada siguiendo las instrucciones del fabricante sobre la tapa de cada tubo (capacidad de 0,25 ml, diámetro de 8 mm). Mientras aún era líquida, la dieta se niveló para retirar el exceso y producir una superficie homogénea.

- 5 Una vez que la dieta se ha establecido, se aplican las formulaciones de ensayo a la superficie de la dieta, a una tasa de 25 µl de formulación no diluida (1 µg/µl de ARNbc de dianas) por replicado. Se deja que las formulaciones de ensayo se sequen y se coloca una larva de polilla de primera fase en cada tubo. La larva se coloca sobre la superficie de la dieta en la tapa y se cierra cuidadosamente el tubo. Los tubos se almacenan boca abajo, sobre las tapas, de tal forma que la larva permanece sobre la superficie de la dieta. Dos veces por semana las larvas se transfieren a nuevos tubos Eppendorf con dieta reciente. Se proporciona a los insectos dieta tratada durante las primeras dos semanas del ensayo y a continuación dieta no tratada.

- 10 Se realizan evaluaciones dos veces por semanas durante un total de 38 días momento en el cual todas las larvas están muertas. En cada evaluación los insectos se evalúan como vivos o muertos y se evalúan en busca de anomalías. Se realizan cuarenta replicados de larvas individuales para cada uno de los tratamientos. Durante la prueba las condiciones de ensayo son 23 a 26 °C y una humedad relativa del 50 al 65 %, con un fotoperíodo de luz:oscuridad de 16:8 horas.

D. Clonación de un fragmento génico de PDD en un vector adecuado para la producción bacteriana de ARN bicatenario activo en insectos

- 20 A continuación hay un ejemplo de clonación de un fragmento de ADN correspondiente a una diana génica de PDD en un vector para la expresión de ARN bicatenario en un hospedador bacteriano, aunque puede usarse cualquier vector que comprende un promotor de T7 o cualquier otro promotor para la transcripción eficaz en bacterias (referencia al documento WO0001846).

- 25 Las secuencias de los cebadores específicos usados para la amplificación de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-PX**. El molde usado es el vector pCR8/GW/TOPO[®] que contiene cualquiera de las secuencias diana. Los cebadores se usan en una reacción PCR con las siguientes condiciones: 5 minutos a 98 °C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El fragmento PCR resultante se analizó en gel de agarosa, se purificó (Kit de extracción de gel QIAquick[®]), se clonó con extremos romos en vector pGNA49A linealizado con *Srf* I y se secuenció. La secuencia del producto PCR resultante corresponde a la secuencia respectiva tal como se proporciona en la **Tabla 8-PX**.

- 30 **E. Expresión y producción de una diana de ARN bicatenario en dos cepas de *Escherichia coli*: (1) AB301-105(DE3), y, (2) BL21(DE3)**

Se siguieron los procedimientos descritos a continuación para expresar niveles adecuados de ARN bicatenario activo en insectos de diana de insectos en bacterias. Se usó una cepa deficiente en RNasall, AB301-105(DE3), en comparación con bacterias que contenían RNasall de tipo silvestre, BL21(DE3).

- 35 *Transformación de AB301-105(DE3) y BL21(DE3)*

- 40 Se añadieron trescientos ng del plásmido y se mezclaron suavemente en una alícuota de 50 µl de la cepa de *E. coli* químicamente competente enfriada en hielo AB301-105(DE3) o BL21(DE3). Las células se incubaron sobre hielo durante 20 minutos antes de someterlas a un tratamiento de choque térmico de 37 °C durante 5 minutos, después de los cuales se pusieron de nuevo sobre hielo durante 5 minutos adicionales. Se añadieron cuatrocientos cincuenta µl de medio SOC a temperatura ambiente a las células y la suspensión se incubó en un agitador (250 rpm) a 37 °C durante 1 hora. Se transfirieron cien µl de la suspensión de células bacterianas a un matraz cónico de 500 ml que contenía 150 ml de caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido suplementado con 100 µg/ml de antibiótico de carbenicilina. El cultivo se incubó en un agitador Innova 4430 (250 rpm) a 37 °C durante toda la noche (16 a 18 horas).

- 45 *Inducción química de la expresión de ARN bicatenario en AB301-105(DE3) y BL21(DE3)*

- 50 La expresión de ARN bicatenario a partir del vector recombinante en la cepa bacteriana AB301-105(DE3) o BL21(DE3) fue posible ya que estaban presentes todos los componentes genéticos para expresión controlada. En presencia del inductor químico isopropiltiogalactósido, o IPTG, la polimerasa T7 dirigirá la transcripción de la secuencia diana en direcciones tanto antisentido como sentido ya que estas están flanqueadas por promotores de T7 orientados de manera opuesta.

- 55 La densidad óptica a 600 nm del cultivo bacteriano de una noche se midió usando un espectrofotómetro adecuado y se ajustó a un valor de 1 mediante la adición de caldo LB reciente. Se transfirieron cincuenta ml de este cultivo a un tubo Falcon[™] de 50 ml y el cultivo se centrifugó después a 3000 g a 15 °C durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 50 ml de medio completo S reciente (medio SNC más 5 µg/ml de colesterol) suplementado con 100 µg/ml de carbenicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias se indujeron durante 2 a 4 horas a temperatura ambiente.

Tratamiento con calor de bacterias

Las bacterias se destruyeron mediante tratamiento con calor para minimizar el riesgo de contaminación de la dieta artificial en las placas de ensayo. Sin embargo, el tratamiento con calor de las bacterias que expresaban ARN bicatenario no es un requisito previo para inducir la toxicidad hacia los insectos debido a la interferencia de ARN. El cultivo bacteriano inducido se centrifugó a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se sometió a 80 °C durante 20 minutos en un baño con agua. Después del tratamiento con calor, el sedimento bacteriano se resuspendió en 1,5 ml de agua MilliQ y la suspensión se transfirió a un tubo de microcentrifuga. Se prepararon y usaron diversos tubos en los bioensayos para cada renovación. Los tubos se conservaron a -20 °C hasta su uso posterior.

5 **F. Pruebas de laboratorio para ensayar *Escherichia coli* que expresan dianas de ARNbc contra *Plutella xylostella***

Bioensayos basados en plantas

Se rocían plantas completas con suspensiones de bacterias inducidas químicamente que expresan ARNbc antes de alimentar a los PDD con las plantas. Se cultivan en una cámara de cultivo de plantas. Las plantas se cubrieron colocando una botella de plástico de 500 ml boca abajo sobre la planta con el cuello de la botella firmemente colocado en el suelo en una maceta y se recortó la base y se cubrió con una fina malla de nailon para permitir el aireamiento, reducir la condensación en su interior e impedir que se escapen los insectos. Se colocan PDD en cada planta tratada en la jaula. Las plantas se tratan con una suspensión de *E. coli* AB301-105(DE3) que portan el vector recombinante o el plásmido pGN29. Se aplican diferentes cantidades de bacterias a las plantas: por ejemplo 66, 22 y 7 unidades, donde una unidad se define como 10⁹ células bacterianas en 1 ml de una suspensión bacteriana a un valor de densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 600 nm. En cada caso, se rocía un volumen total de entre 1 y 10 ml sobre la planta con la ayuda de un vaporizador. Se usa una planta por tratamiento en este ensayo. Se cuenta el número de supervivientes y se registra el peso de cada superviviente.

El rociado de las plantas con una suspensión de la cepa bacteriana de *E. coli* AB301-105(DE3) que expresa ARNbc diana de vector recombinante da lugar a un drástico aumento en la mortalidad de los insectos en comparación con el control de pGN29. Estos experimentos demuestran que el ARN bicatenario correspondiente a una secuencia diana de gen de insecto producida en sistemas de expresión bacteriana de tipo silvestre o deficientes en RNasall es tóxico para el insecto en cuanto a aumentos sustanciales en la mortalidad de los insectos y en el retraso en el crecimiento/ desarrollo para los supervivientes larvarios. También está claro a partir de estos experimentos que se proporciona un ejemplo para proteger eficazmente a plantas/cultivos del daño por insectos mediante el uso de una pulverización de una formulación que consiste en bacterias que expresan ARN bicatenario correspondiente a un gen diana de insecto.

Ejemplo 12: *Acheta domesticus* (grillo doméstico)**A. Clonación de secuencias parciales de *Acheta domesticus***

35 Se aisló ARN intacto de alta calidad de todos los estadios diferentes de *Acheta domesticus* (grillo doméstico; Fuente: Dr. Lara Senior, Insect Investigations Ltd., Capital Business Park, Wentloog, Cardiff, CF3 2PX, Gales, Reino Unido) usando reactivo TRIzol[®] siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico presente en la preparación de ARN se retiró mediante tratamiento con DNasa siguiendo las instrucciones del fabricante. Se generó ADNc usando un kit comercialmente disponible (transcriptasa inversa SuperScript[®] III) siguiendo las instrucciones del fabricante.

40 Para aislar secuencias de ADNc que comprendían una porción de los genes AD001, AD002, AD009, AD015 y AD016, se realizó una serie de reacciones PCR con cebadores degradados usando Amplitaq Gold[®] siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las secuencias de los cebadores degradados usados para la amplificación de cada uno de los genes se proporcionan en la **Tabla 2-AD**. Estos cebadores se usaron en respectivas reacciones PCR con las siguientes condiciones: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 50 °C y 1 minuto y 30 segundos a 72 °C, seguido de 7 minutos a 72 °C. Los fragmentos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa, se purificaron (Kit de extracción de gel QIAquick[®]), se clonaron en el vector pCR8/GW/TOPO[®] y se secuenciaron. Las secuencias de los productos PCR resultantes se representan mediante las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 2-AD** y se citan como las secuencias parciales. Las secuencias de aminoácidos parciales correspondientes se representan por las SEC ID N° respectivas tal como se proporcionan en la **Tabla 3-AD**,

B. Producción de ARNbc de los genes de *Acheta domesticus*

Se sintetizó ARNbc en cantidades de miligramo usando el kit comercialmente disponible Sistema de ARNi T7 Ribomax[™] Express. En primer lugar se generaron por separado dos moldes promotores de ARN polimerasa T7 en dirección 5' individuales en dos reacciones PCR individuales, conteniendo cada una la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor de T7.

Para cada uno de los genes diana, se generó el molde de T7 en sentido usando cebadores directo e inverso específicos de T7. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-AD**. Las condiciones de las reacciones PCR fueron las siguientes: 1 minuto a 95 °C, seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C (-0,5 °C/ciclo) y 1 minuto a 72 °C, seguido de 15 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 50 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El molde de T7 antisentido se generó usando cebadores directos e inversos de T7 específicos en una reacción PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Las secuencias de los respectivos cebadores para amplificar el molde anti-sentido para cada uno de los genes diana se proporcionan en la **Tabla 8-AD**. Los productos PCR resultantes se analizaron en gel de agarosa y se purificaron mediante el kit de purificación PCR (kit de purificación PCR Qiaquick®) y precipitación de NaClO₄. Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclaron para transcribirse y las hebras de ARN resultantes se hibridaron, se trataron con DNasa y RNasa y se purificaron con acetato de sodio, siguiendo las instrucciones del fabricante. La hebra sentido del ARNbc resultante para cada uno de los genes diana se proporciona en la **Tabla 8-AD**.

C. Pruebas de laboratorio para ensayar dianas de ARNbc, usando dieta artificial para actividad contra larvas de *Acheta domesticus*

Se mantuvieron grillos domésticos, *Acheta domesticus*, en Insect Investigations Ltd. (origen: Blades Biological Ltd., Kent, Reino Unido). Los insectos se criaron con microgránulos de salvado y hojas de repollo. Se seleccionaron ninfas de ambos sexos del mismo tamaño y no más de 5 días de edad para su uso en la prueba. Se mezcló ARN bicatenario con una dieta de roedor en gránulos basada en trigo (dieta convencional de rata y ratón, B & K Universal Ltd., Grimston, Aldbrough, Hull, Reino Unido). La dieta, BK001P, contiene los siguientes ingredientes en orden descendente en peso: trigo, soja, harina forrajera de trigo, cebada, aglutinante de gránulos, vitamina 5 de roedor, mezcla de grasas, fosfato dicálcico, carbamatos fungicidas. La dieta granulada para roedores se tritura finamente y se trata con calor en un horno de microondas antes de mezclar, para inactivar cualquier componente enzimático. Toda la dieta de roedor se toma del mismo lote para asegurar la uniformidad. La dieta triturada y el ARNbc se mezclan exhaustivamente y se moldean en gránulos pequeños del mismo peso, que se dejan secar durante toda la noche a temperatura ambiente.

Se aplicaron muestras de ARN bicatenario de dianas y control de gfp a concentraciones de 10 µg/µl a una relación de 1 g de dieta molida más 1 ml de solución de ARNbc, dando como resultado de este modo una tasa de aplicación de 10 mg de ARNbc por gramo de gránulos. Los gránulos se reemplazan cada semana. Se proporciona a los insectos gránulos tratados durante las primeras tres semanas de la prueba. A continuación se proporcionan gránulos no tratados. Los insectos se mantienen dentro de recipientes de plástico con tapa (9 cm de diámetro, 4,5 cm de profundidad), diez por recipiente. Cada arena contiene un gránulo cebo tratado y una fuente de agua (bola de algodón húmeda), cada uno colocado en un bote de bajo peso separado. El agua se repone a voluntad durante todo el experimento.

Se realizan evaluaciones a intervalos de dos veces por semana, sin haber más de cuatro días entre las evaluaciones, hasta que todos los insectos habían muerto o mudado al estadio adulto (84 días). En cada evaluación los insectos se evalúan como vivos o muertos y se examinan en busca de anomalías. Desde el día 46 en adelante, una vez que ha comenzado la muda a adulto, todos los insectos (vivos y muertos) se evalúan como ninfa o adulto. Los insectos supervivientes se pesan en el día 55 de la prueba. Se realizan cuatro replicados para cada uno de los tratamientos. Durante la prueba las condiciones de ensayo son 25 a 33 °C y una humedad relativa del 20 al 25 %, con un fotoperíodo de 12:12 horas de luz:oscuridad.

D. Clonación de un fragmento génico de GD en un vector adecuado para la producción bacteriana de ARN bicatenario activo en insectos

A continuación hay un ejemplo de clonación de un fragmento de ADN correspondiente a una diana génica de GD en un vector para la expresión de ARN bicatenario en un hospedador bacteriano, aunque puede usarse cualquier vector que comprende un promotor de T7 o cualquier otro promotor para la transcripción eficaz en bacterias (referencia al documento WO0001846).

Las secuencias de los cebadores específicos usados para la amplificación de los genes diana se proporcionan en la Tabla 8. El molde usado es el vector pCR8/GW/TOPO® que contiene cualquiera de las secuencias diana. Los cebadores se usan en una reacción PCR con las siguientes condiciones: 5 minutos a 98 °C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C. El fragmento PCR resultante se analizó en gel de agarosa, se purificó (Kit de extracción de gel QIAquick®), se clonó con extremos romos en vector pGNA49A linealizado con *Srf* I y se secuenció. La secuencia del producto PCR resultante corresponde a la secuencia respectiva tal como se proporciona en la **Tabla 8-AD**.

E. Expresión y producción de una diana de ARN bicatenario en dos cepas de *Escherichia coli*: (1) AB301-105(DE3), y, (2) BL21(DE3)

Se siguieron los procedimientos descritos a continuación para expresar niveles adecuados de ARN bicatenario activo en insectos de diana de insectos en bacterias. Se usó una cepa deficiente en RNasIII, AB301-105(DE3), en

comparación con bacterias que contenían RNasalll de tipo silvestre, BL21(DE3).

Transformación de AB301-105(DE3) y BL21(DE3)

5 Se añadieron trescientos ng del plásmido y se mezclaron suavemente en una alícuota de 50 μ l de la cepa de *E. coli* químicamente competente enfriada en hielo AB301-105(DE3) o BL21(DE3). Las células se incubaron sobre hielo durante 20 minutos antes de someterlas a un tratamiento de choque térmico de 37 °C durante 5 minutos, después de los cuales se pusieron de nuevo sobre hielo durante 5 minutos adicionales. Se añadieron cuatrocientos cincuenta μ l de medio SOC a temperatura ambiente a las células y la suspensión se incubó en un agitador (250 rpm) a 37 °C durante 1 hora. Se transfirieron cien μ l de la suspensión de células bacterianas a un matraz cónico de 500 ml que contenía 150 ml de caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido suplementado con 100 μ g/ml de antibiótico de carbenicilina. El cultivo se incubó en un agitador Innova 4430 (250 rpm) a 37 °C durante toda la noche (16 a 18 horas).

Inducción química de la expresión de ARN bicatenario en AB301-105(DE3) y BL21(DE3)

15 La expresión de ARN bicatenario a partir del vector recombinante en la cepa bacteriana AB301-105(DE3) o BL21(DE3) fue posible ya que estaban presentes todos los componentes genéticos para expresión controlada. En presencia del inductor químico isopropiltiogalactósido, o IPTG, la polimerasa T7 dirigirá la transcripción de la secuencia diana en direcciones tanto antisentido como sentido ya que estas están flanqueadas por promotores de T7 orientados de manera opuesta.

20 La densidad óptica a 600 nm del cultivo bacteriano de una noche se midió usando un espectrofotómetro adecuado y se ajustó a un valor de 1 mediante la adición de caldo LB reciente. Se transfirieron cincuenta ml de este cultivo a un tubo Falcon™ de 50 ml y el cultivo se centrifugó después a 3000 g a 15 °C durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 50 ml de medio completo S reciente (medio SNC más 5 μ g/ml de colesterol) suplementado con 100 μ g/ml de carbenicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias se indujeron durante 2 a 4 horas a temperatura ambiente.

Tratamiento con calor de bacterias

25 Las bacterias se destruyeron mediante tratamiento con calor para minimizar el riesgo de contaminación de la dieta artificial en las placas de ensayo. Sin embargo, el tratamiento con calor de las bacterias que expresaban ARN bicatenario no es un requisito previo para inducir la toxicidad hacia los insectos debido a la interferencia de ARN. El cultivo bacteriano inducido se centrifugó a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se sometió a 80 °C durante 20 minutos en un baño con agua. Después del tratamiento con calor, el sedimento bacteriano se resuspendió en 1,5 ml de agua MilliQ y la suspensión se transfirió a un tubo de microcentrifuga. Se prepararon y usaron diversos tubos en los bioensayos para cada renovación. Los tubos se conservaron a -20 °C hasta su uso posterior.

F. Pruebas de laboratorio para ensayar *Escherichia coli* que expresan dianas de ARNbc contra *Acheta domesticus*

35 *Bioensayos basados en plantas*

Se rocían plantas completas con suspensiones de bacterias inducidas químicamente que expresan ARNbc antes de alimentar a los GD con las plantas. Se cultivan en una cámara de cultivo de plantas. Las plantas se cubrieron colocando una botella de plástico de 500 ml boca abajo sobre la planta con el cuello de la botella firmemente colocado en el suelo en una maceta y se recortó la base y se cubrió con una fina malla de nailon para permitir el aireamiento, reducir la condensación en su interior e impedir que se escapen los insectos. Se colocan GD en cada planta tratada en la jaula. Las plantas se tratan con una suspensión de *E. coli* AB301-105(DE3) que portan el vector recombinante o el plásmido pGN29. Se aplican diferentes cantidades de bacterias a las plantas: por ejemplo 66, 22 y 7 unidades, donde una unidad se define como 10⁹ células bacterianas en 1 ml de una suspensión bacteriana a un valor de densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 600 nm. En cada caso, se rocía un volumen total de entre 1 y 10 ml sobre la planta con la ayuda de un vaporizador. Se usa una planta por tratamiento en este ensayo. Se cuenta el número de supervivientes y se registra el peso de cada superviviente.

El rociado de las plantas con una suspensión de la cepa bacteriana de *E. coli* AB301-105(DE3) que expresa ARNbc diana de vector recombinante da lugar a un drástico aumento en la mortalidad de los insectos en comparación con el control de pGN29. Estos experimentos demuestran que el ARN bicatenario correspondiente a una secuencia diana de gen de insecto producida en sistemas de expresión bacteriana de tipo silvestre o deficientes en RNasalll es tóxico para el insecto en cuanto a aumentos sustanciales en la mortalidad de los insectos y en el retraso en el crecimiento/ desarrollo para los supervivientes larvarios. También está claro a partir de estos experimentos que se proporciona un ejemplo para proteger eficazmente a plantas/cultivos del daño por insectos mediante el uso de una pulverización de una formulación que consiste en bacterias que expresan ARN bicatenario correspondiente a un gen diana de insecto.

Ejemplo 13: *Pyricularia grisea* (tizón del arroz)

A. Clonación de secuencias parciales de *P. grisea*

Se aísla ARN intacto, de alta calidad de diferentes estadios de crecimiento de *P. grisea* usando reactivo TRIzol® siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico presente en la preparación de ARN se retira mediante tratamiento con DNasa siguiendo las instrucciones del fabricante. Se genera ADNc usando un kit comercialmente disponible (transcriptasa inversa SuperScript® III) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar secuencias de ADNc que comprenden una porción del gen diana, se realiza PCR con cebadores degradados usando Amplitaq Gold® siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR resultantes se fraccionan y secuencian.

B. Producción de ARNbc de genes de *P. grisea*

Se sintetiza ARNbc en cantidades de miligramo usando un kit comercialmente disponible, tal como sistema de ARNi T7 Ribomax™ Express, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos PCR resultantes se analizan en gel de agarosa y se purifican mediante el kit de purificación PCR (por ejemplo, kit de purificación PCR Qiaquick®) y precipitación de NaClO₄. Los moldes directo e inverso de T7 generados se mezclan y las hebras de ARN resultantes se hibridan, después se tratan con DNasa y RNasa y se purifican con acetato de sodio, siguiendo las instrucciones del fabricante.

C. Expresión y producción de una diana de ARN bicatenario en dos cepas de *Escherichia coli*: (1) AB301-105(DE3), y, (2) BL21(DE3)

Se siguieron los procedimientos descritos a continuación para expresar niveles adecuados de ARN bicatenario de diana fúngica en bacterias. Se usó una cepa deficiente en RNasalll, AB301-105(DE3), en comparación con bacterias que contenían RNasalll de tipo silvestre, BL21(DE3).

Transformación de AB301-105(DE3) y BL21(DE3)

Se añadieron trescientos ng del plásmido y se mezclaron suavemente en una alícuota de 50 µl de la cepa de *E. coli* químicamente competente enfriada en hielo AB301-105(DE3) o BL21(DE3). Las células se incubaron sobre hielo durante 20 minutos antes de someterlas a un tratamiento de choque térmico de 37 °C durante 5 minutos, después de los cuales se pusieron de nuevo sobre hielo durante 5 minutos adicionales. Se añadieron cuatrocientos cincuenta µl de medio SOC a temperatura ambiente a las células y la suspensión se incubó en un agitador (250 rpm) a 37 °C durante 1 hora. Se transfirieron cien µl de la suspensión de células bacterianas a un matraz cónico de 500 ml que contenía 150 ml de caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido suplementado con 100 µg/ml de antibiótico de carbenicilina. El cultivo se incubó en un agitador Innova 4430 (250 rpm) a 37 °C durante toda la noche (16 a 18 horas).

Inducción química de la expresión de ARN bicatenario en AB301-105(DE3) y BL21(DE3)

La expresión de ARN bicatenario a partir del vector recombinante en la cepa bacteriana AB301-105(DE3) o BL21(DE3) fue posible ya que estaban presentes todos los componentes genéticos para expresión controlada. En presencia del inductor químico isopropiltiogalactósido, o IPTG, la polimerasa T7 dirigirá la transcripción de la secuencia diana en direcciones tanto antisentido como sentido ya que estas están flanqueadas por promotores de T7 orientados de manera opuesta.

La densidad óptica a 600 nm del cultivo bacteriano de una noche se midió usando un espectrofotómetro adecuado y se ajustó a un valor de 1 mediante la adición de caldo LB reciente. Se transfirieron cincuenta ml de este cultivo a un tubo Falcon™ de 50 ml y el cultivo se centrifugó después a 3000 g a 15 °C durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 50 ml de medio completo S reciente (medio SNC más 5 µg/ml de colesterol) suplementado con 100 µg/ml de carbenicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias se indujeron durante 2 a 4 horas a temperatura ambiente.

Tratamiento con calor de bacterias

Las bacterias se destruyeron mediante tratamiento con calor para minimizar el riesgo de contaminación de la dieta artificial en las placas de ensayo. Sin embargo, el tratamiento con calor de las bacterias que expresaban ARN bicatenario no es un requisito previo para inducir la toxicidad hacia los insectos debido a la interferencia de ARN. El cultivo bacteriano inducido se centrifugó a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se sometió a 80 °C durante 20 minutos en un baño con agua. Después del tratamiento con calor, el sedimento bacteriano se resuspendió en 1,5 ml de agua MilliQ y la suspensión se transfirió a un tubo de microcentrífuga. Se prepararon y usaron diversos tubos en los bioensayos para cada renovación. Los tubos se conservaron a -20 °C hasta su uso posterior.

Tabla 1 A

DI de <i>C.elegans</i>	ID de <i>D.melanogaster</i>	Descripción	Exploración de ARNi Devgen
B0250.1	CG1263	Proteína de subunidad ribosómica grande L8.	Aguda letal o letal
B0336.10	CG3661	Proteína de subunidad ribosómica grande L23.	Aguda letal o letal
B0336.2	CG8385	Factor de ribosilación de ADP.	Aguda letal o letal
B0464.1	CG3821	Aspartil(D) ARNt sintetasa putativa.	Aguda letal o letal
C01G8.5	CG10701	Ortólogo de la familia ERM de enlazantes citoesqueléticos.	Aguda letal o letal
C01H6.5	CG33183	Receptor de hormonas nucleares que se requiere en todas las mudas larvianas	Aguda letal o letal
C02C6.1	CG18102	Miembro de la clase génica relacionada con DYNamina	Aguda letal o letal
C03D6.8	CG6764	Proteína de subunidad ribosómica grande L24 (Rlp24p).	Aguda letal o letal
C04F12.4	CG6253	rpl-14 codifica una proteína de subunidad ribosómica grande de L14.	Aguda letal o letal
C04H5.6	CG10689	Producto con actividad ARN helicasa (EC:2.7.7.) implicado en el corte y empalme de ARNm nuclear, mediante espliceosoma que es un componente del complejo de espliceosoma.	Embrionaria letal o estéril
C13B9.3	CG14813	Subunidad delta del complejo de coatómero (COPI).	Aguda letal o letal
C17H12.14	CG1088	Miembro de la clase génica de ATPasa vacuolar H.	Aguda letal o letal
C26E6.4	CG3180	ARN polimerasa II dirigida por ADN.	Aguda letal o letal
F23F12.6	CG16916	Subunidad de ATPasa triple A del subcomplejo de base de partícula reguladora 19S del proteasoma 26S (RP)	Aguda letal o letal
F57B9.10	CG10149	Miembro de la clase génica de tipo no ATPasa, partícula reguladora del proteasoma.	Aguda letal o letal
K11D9.2	CG3725	Homólogo de Ca ²⁺ ATPasa del retículo sarcoendoplásmico.	Embrionaria letal o estéril
T20G5.1	CG9012	Cadena pesada de clatrina	Aguda letal o letal
T20H4.3	CG5394	Prolii-ARNt sintetasa (ProRS) citoplásmica predicha.	Aguda letal o letal
T21E12.4	CG7507	Homólogo de cadena pesada de dineína citoplasmática.	Aguda letal o letal
C05C10.3	CG1140	ortólogo del gen humano 3-OXOÁCIDO COA TRANSFERASA	Aguda letal o letal
C09D4.5	CG2746	Proteína ribosómica L19, constituyente estructural de ribosoma implicado en la biosíntesis de proteínas que se localiza en el ribosoma.	Aguda letal o letal
C09E10.2	CG31140	Ortólogo de diacilglicerol cinasa implicado en el movimiento, oviposición y transmisión sináptica y se expresa en neuronas.	Aguda letal o letal
C13B9.3	CG14813	Subunidad delta del coatómero (COPI).	Aguda letal o letal
C14B9.7	CG12775	Proteína de subunidad ribosómica grande L21 (RPL-21) implicada en la biosíntesis de proteínas.	Aguda letal o letal
C15H11.7	CG30382	Subunidad tipo 6 alfa de la partícula del núcleo de proteasa 20S del proteasoma 26S (CP).	Aguda letal o letal
C17E4.9	CG9261	Proteína implicada en el complejo de ATPasa que intercambia Na ⁺ /K ⁺ .	Embrionaria letal o estéril
C17H12.14	CG1088	Subunidad E de V-ATPasa.	Aguda letal o letal
C23G10.4	CG11888	Subunidad no ATPasa del subcomplejo de base de partícula reguladora 19S del proteasoma 26S (RPN-2).	Aguda letal o letal
C26D10.2	CG7269	Producto con actividad helicasa implicado en el corte y empalme de ARNm nuclear, mediante espliceosoma que se localiza en el núcleo.	Aguda letal o letal
C26E6.4	CG3180	Subunidad de 140 kD de ARN polimerasa II (RpII 140), actividad de ARN polimerasa dirigida por ADN (EC:2.7.7.6) implicada en la transcripción del promotor Pol II que es un componente del complejo de núcleo de ARN polimerasa II dirigida por ADN.	Aguda letal o letal
C26F1.4	CG15697	Producto con función en la biosíntesis de proteínas y ubiquitina en la degradación de proteínas.	Aguda letal o letal
C30C11.1	CG12220	Función desconocida.	Aguda letal o letal
C30C11.2	CG10484	Miembro de la clase génica de tipo no ATPasa, partícula reguladora del proteasoma.	Aguda letal o letal
C36A4.2	CG13977	Citocromo P450.	Aguda letal o letal
C37C3.6	CG33103	Ortólogo de trombospondina, papilina y lacunina.	Aguda letal o letal

ES 2 568 933 T3

DI de <i>C.elegans</i>	ID de <i>D. melanogaster</i>	Descripción	Exploración de ARNi Devgen
C37H5.8	CG8542	Miembro de la clase génica de proteína de choque térmico.	Aguda letal o letal
C39F7.4	CG3320	Proteína Rab-1 implicada en la adhesión celular.	Aguda letal o letal
C41C4.8	CG2331	ATPasa del retículo endoplasmático transicional TER94, organización y biogénesis del Golgi.	Retardo del crecimiento o detención del crecimiento
C42D8.5	CG8827	Proteína similar a ACE.	Aguda letal o letal
C47E12.5	CG1782	Enzima activadora de ubiquitina, función en una reacción dependiente de ATP que activa ubiquitina antes de su conjugación a proteínas que se degradarán posteriormente por el proteasoma 26S.	Aguda letal o letal
C47E8.5	CG1242	Miembro de la clase génica de formación de DAuer anómala.	Aguda letal o letal
C49H3.11	CG5920	Proteína de subunidad ribosómica pequeña S2.	Aguda letal o letal
C52E4.4	CG1341	Miembro de la clase génica de tipo ATPasa, partícula reguladora del proteasoma.	Aguda letal o letal
C56C10.3	CG8055	Proteína vehículo potencialmente implicada en el transporte intracelular de proteínas.	Retardo del crecimiento o detención del crecimiento
CD4.6	CG4904	Subunidad tipo 1 alfa de la partícula del núcleo de proteasa 20S del proteasoma 26S (CP).	Aguda letal o letal
D1007.12	CG9282	Proteína de subunidad ribosómica grande L24.	Aguda letal o letal
D1054.2	CG5266	Miembro de la clase génica de subunidad alfa de proteasoma.	Aguda letal o letal
D1081.8	CG6905	Proteína transformante de MYB.	Aguda letal o letal
F07D10.1	CG7726	Proteína de subunidad ribosómica grande L11 (RPL-11.2) implicada en la biosíntesis de proteínas.	Aguda letal o letal
F11C3.3	CG17927	Cadena pesada de miosina muscular (MHC B).	Aguda letal o letal
F13B10.2	CG4863	Proteína L3 de subunidad ribosómica grande (rpl-3).	Aguda letal o letal
F16A11.2	CG9987	Tipo de proteína hipotética de <i>Methanococcus</i> 0682.	Aguda letal o letal
F20B6.2	CG17369	Subunidad B de V-ATPasa.	Retardo del crecimiento o detención del crecimiento
F23F12.6	CG16916	Subunidad de ATPasa triple A del subcomplejo de base de partícula reguladora 19S del proteasoma 26S (RP) (RPT-3).	Aguda letal o letal
F25H5.4	CG2238	Factor de elongación de la traducción 2 (EF-2), una proteína de unión a GTP implicada en la síntesis de proteínas.	Retardo del crecimiento o detención del crecimiento
F26D10.3	CG4264	Miembro de la clase génica de proteína de choque térmico.	Aguda letal o letal
F28C6.7	CG6846	Proteína de subunidad ribosómica grande L26 (RPL-26) implicada en la biosíntesis de proteínas.	Embrionaria letal o estéril
F28D1.7	CG8415	Proteína de subunidad ribosómica pequeña (S23) (RPS-23) implicada en la biosíntesis de proteínas.	Aguda letal o letal
F29G9.5	CG5289	Miembro de la clase génica de tipo ATPasa, partícula reguladora del proteasoma.	Aguda letal o letal
F32H2.5	CG3523	Proteína mitocondrial.	Aguda letal o letal
F37C12.11	CG2986	Proteína de subunidad ribosómica pequeña (S21) (RPS-21) implicada en la biosíntesis de proteínas.	Aguda letal o letal
F37C12.4	CG7622	Proteína de subunidad ribosómica grande L36 (RPL-36) implicada en la biosíntesis de proteínas.	Aguda letal o letal
F37C12.9	CG1527	Proteína de subunidad ribosómica pequeña (S14) (RPS-14) implicada en la biosíntesis de proteínas.	Aguda letal o letal
F38E11.5	CG6699	Subunidad beta' (beta-prima) del complejo de coatómero (COPI).	Aguda letal o letal
F39B2.6	CG10305	Proteína de subunidad ribosómica pequeña (S26) (RPS-26) implicada en la biosíntesis de proteínas.	Aguda letal o letal

ES 2 568 933 T3

DI de <i>C.elegans</i>	ID de <i>D. melanogaster</i>	Descripción	Exploración de ARNi Devgen
F39H11.5	CG12000	Miembro de la clase génica de subunidad beta de proteasoma.	Aguda letal o letal
F40F8.10	CG3395	Proteína ribosómica S9 (RpS9), constituyente estructural de ribosoma implicado en la biosíntesis de proteínas que es un componente de la subunidad ribosómica pequeña citosólica.	Aguda letal o letal
F42C5.8	CG7808	Proteína de subunidad ribosómica pequeña (S8) (RPS-8) implicada en la biosíntesis de proteínas.	Aguda letal o letal
F49C12.8	CG5378	Miembro de la clase génica de tipo no ATPasa, partícula reguladora del proteasoma.	Aguda letal o letal
F53A3.3	CG2033	Proteína de subunidad ribosómica pequeña S15a.	Aguda letal o letal
F53G12.10	CG4897	Proteína L7 de subunidad ribosómica grande (rpl-7).	Aguda letal o letal
F54A3.3	CG8977	Función desconocida.	Aguda letal o letal
F54E2.3	CG1915	Producto con actividad cinasa de cadena ligera de miosina sallimus (sls) (EC:2.7.1.117) implicado en la condensación de cromosoma mitótico que se localiza en el núcleo.	
F54E7.2	CG11271	Proteína de subunidad ribosómica pequeña (S12) (RPS-12) implicada en la biosíntesis de proteínas.	Aguda letal o letal
F55A11.2	CG4214	Miembro de la clase génica de SYNtaxina.	Aguda letal o letal
F55A3.3	CG1828	Factor de transcripción.	Aguda letal o letal
F55C10.1	CG11217	Ortólogo de calcineurina B, la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 2B.	Aguda letal o letal
F56F3.5	CG2168	rps-1 codifica una proteína de subunidad ribosómica pequeña S3A.	Aguda letal o letal
F57B9.10	CG10149	Miembro de la clase génica de tipo no ATPasa, partícula reguladora del proteasoma.	Aguda letal o letal
F58F12.1	CG2968	ATP sintasa.	Aguda letal o letal
F59E10.3	CG3948	Subunidad zeta del complejo de coatómero (COPI).	Aguda letal o letal
JC8.3	CG3195	Proteína L12 de subunidad ribosómica grande (rpl-12).	Aguda letal o letal
K01G5.4	CG1404	GTPasa monomérica pequeña RAN potencial (adhesión celular).	Aguda letal o letal
K04F10.4	CG 18734	Subtilasa.	Aguda letal o letal
K05C4.1	CG12323	Miembro de la clase génica de subunidad beta de proteasoma.	Aguda letal o letal
K07D4.3	CG18174	Partícula reguladora del proteasoma potencial, subcomplejo de tapa, rpn11	Aguda letal o letal
K11D9.2	CG3725	Ca ²⁺ ATPasa del retículo sarcoendoplásmico.	Embrionaria letal o estéril; Aguda letal o letal
M03F4.2	CG4027	Una actina que se expresa en la pared corporal y músculos vulvares y la espermateca.	Aguda letal o letal
R06A4.9	CG1109	Seis repeticiones de WD40.	Aguda letal o letal
R10E11.1	CG15319	Cofactor transcripcional potencial.	Aguda letal o letal
R12E2.3	CG3416	Proteína con actividad endopeptidasa implicada en la proteólisis y peptidólisis.	Aguda letal o letal
F10C1.2	CG10119	Miembro de la clase génica B de filamento intermedio.	Embrionaria letal o estéril
F35G12.8	CG11397	Homólogo de la subunidad SMC4 de condensina mitótica.	Embrionaria letal o estéril
F53G12.1	CG5771	Homólogo de GTPasa.	Embrionaria letal o estéril
F54E7.3	CG5055	Proteína que contiene dominio PDZ.	Embrionaria letal o estéril
H28O16.1	CG3612	ATP sintasa.	Retardo del crecimiento o detención del crecimiento
K12C11.2	CG4494	Miembro de la clase génica homóloga de SUMO (relacionada con ubiquitina).	Embrionaria letal o estéril
R12E2.3	CG3416	Miembro de la clase génica de tipo no ATPasa, partícula reguladora del proteasoma.	Aguda letal o letal

ES 2 568 933 T3

DI de <i>C.elegans</i>	ID de <i>D. melanogaster</i>	Descripción	Exploración de ARNi Devgen
R13A5.8	CG6141	Proteína ribosómica L9, constituyente estructural de ribosoma implicado en la biosíntesis de proteínas que se localiza en el ribosoma.	Aguda letal o letal
T01C3.6	CG4046	rps-16 codifica una proteína de subunidad ribosómica pequeña S16.	Aguda letal o letal
T01H3.1	CG7007	Proteína de tipo proteína proteolipídica PPA1.	Aguda letal o letal
T05C12.7	CG5374	Chaperonina citosólica.	Aguda letal o letal
T05H4.6	CG5605	Subunidad 1 del factor de liberación de cadena peptídica eucariota.	Aguda letal o letal
T10H9.4	CG17248	N-sinaptobrevina; v-SNARE, transporte mediado por vesículas, vesícula sináptica.	
T14F9.1	CG17332	Subunidad de ATPasa.	Retardo del crecimiento o detención del crecimiento
T20G5.1	CG9012	Cadena pesada de clatrina	Aguda letal o letal
T21B10.7	CG7033	Proteína 1 de complejo t.	Embrionaria letal o estéril
W09B12.1	CG17907	Acetilcolinesterasa.	
T27F2.1	CG8264	Miembro de la clase génica homóloga SKIP (proteína que interactúa con Ski) de mamífero.	Aguda letal o letal
ZC434.5	CG5394	Glutamil-ARNt sintetasa mitocondrial predicha (GluRS).	Aguda letal o letal
B0511.6	CG6375	Helicasa.	Embrionaria letal o estéril
DY3.2	CG10119	Lamina nuclear; proteína LMN-1.	Retardo del crecimiento o detención del crecimiento
R13G10.1	CG11397	Homólogo de la subunidad SMC4 de condensina mitótica.	Tipo silvestre
T26E3.7	CG3612	Proteína mitocondrial predicha.	Retardo del crecimiento o detención del crecimiento
Y113G7A.3	CG1250	Activador de GTPasa, transporte de proteínas de ER al Golgi, componente de la pila del Golgi.	Aguda letal o letal
Y43B11AR.4	CG11276	Proteína ribosómica S4 (RpS4), constituyente estructural de ribosoma implicado en la biosíntesis de proteínas que es un componente de la subunidad ribosómica pequeña citosólica.	Aguda letal o letal
Y46G5A.4	CG5931	Gen Y46G5A.4.	Aguda letal o letal
Y71F9AL.17	CG7961	Subunidad alfa del complejo de coatómero (COPI).	Aguda letal o letal
Y76B12C.7	CG10110	Factor de escisión génica y especificidad de poliadenilación.	Embrionaria letal o estéril
Y37D8A.10	CG1751	Función desconocida.	Embrionaria letal o estéril
CG7765	C06G3.2	Miembro de la clase génica de proteína de tipo kinesina.	
CG10922	C44E4.4	Proteína de unión a ARN.	Embrionaria letal o estéril
CG4145	F01G12.5	Colágeno de tipo IV alfa-2.	Embrionaria letal o estéril
CG13391	F28H1.3	Alanil-ARNt sintetasa (AlaRS) citoplasmática no predicha.	Retardo del crecimiento o detención del crecimiento
CG7765	R05D3.7	Miembro de la clase génica descoordinada.	Embrionaria letal o estéril
CG7398	R06A4.4	Miembro de la clase génica de la familia de importina beta.	Embrionaria letal o estéril
CG7436	T17E9.2	Función desconocida.	Embrionaria letal o estéril
CG2666	T25G3.2	Quitina sintasa potencial.	Embrionaria letal o estéril

DI de <i>C.elegans</i>	ID de <i>D. melanogaster</i>	Descripción	Exploración de ARNi Devgen
CG17603	W04A8.7	Factor asociado a proteína de unión a TATA, TAFIL (TAFII250).	Embrionaria letal o estéril

Tablas 1-LD/PC/MP/NL

ID de diana	Identificador Dm	SEC ID N° NA	SEC ID N° AA	Función (basada en Flybase)
LD027	CG6699	23	24	Proteína coatómero beta, subunidad de un complejo multimérico que forma un revestimiento de vesícula de membrana
PC027	CG6699	259	260	
MP027	CG6699	896	897	
NL027	CG6699	1113	1114	

Tabla 2-LD

ID de diana	Cebador directo 5' → 3'	Cebador inverso 5' → 3'	Secuencia de ADNc (hebra con sentido) 5' → 3'
LD001	SEC ID N°: 25	SEC ID N°: 26	SEC ID N°: 1
LD002	SEC ID N°: 27	SEC ID N°: 28	SEC ID N°: 3
LD003	SEC ID N°: 29	SEC ID N°: 30	SEC ID N°: 5
LD006	SEC ID N°: 31	SEC ID N°: 32	SEC ID N°: 7
LD007	SEC ID N°: 33	SEC ID N°: 34	SEC ID N°: 9
LD010	SEC ID N°: 35	SEC ID N°: 36	SEC ID N°: 11
LD011	SEC ID N°: 37	SEC ID N°: 38	SEC ID N°: 13
LD014	SEC ID N°: 39	SEC ID N°: 40	SEC ID N°: 15
LD014_F1			SEC ID N°: 159
LD014_F2			SEC ID N°: 160
LD014_C1			SEC ID N°: 161
LD014_C2			SEC ID N°: 162
LD015	SEC ID N°: 41	SEC ID N°: 42	SEC ID N°: 17
LD016	SEC ID N°: 43	SEC ID N°: 44	SEC ID N°: 19
LD018	SEC ID N°: 45	SEC ID N°: 46	SEC ID N°: 21
LD027	SEC ID N°: 47	SEC ID N°: 48	SEC ID N°: 23

Tabla 3-LD

Secuencia de aminoácidos correspondiente de clon de ADNc
SEC ID N°: 2 (fase +1)
SEC ID N°: 4 (fase -3)
SEC ID N°: 6 (fase -2)
SEC ID N°: 8 (fase +1)
SEC ID N°: 10 (fase +1)
SEC ID N°: 12 (fase +1)
SEC ID N°: 14 (fase -1)
SEC ID N°: 16 (fase +3)
SEC ID N°: 18 (fase -1)
SEC ID N°: 20 (fase -2)
SEC ID N°: 22 (fase +2)
SEC ID N°: 24 (fase +1)

Tabla 2-PC

ID de diana	Cebador directo 5' → 3'	Cebador inverso 5' → 3'	Secuencia de ADNc (hebra con sentido) 5' → 3'
PC001	SEC ID N°: 261	SEC ID N°: 262	SEC ID N°: 247
PC003	SEC ID N°: 263	SEC ID N°: 264	SEC ID N°: 249
PC005	SEC ID N°: 265	SEC ID N°: 266	SEC ID N°: 251
PC010	SEC ID N°: 267	SEC ID N°: 268	SEC ID N°: 253
PC014	SEC ID N°: 269	SEC ID N°: 270	SEC ID N°: 255
PC016	SEC ID N°: 271	SEC ID N°: 272	SEC ID N°: 257
PC027	SEC ID N°: 273	SEC ID N°: 274	SEC ID N°: 259

Tabla 3-PC

Secuencia de aminoácidos correspondiente de clon de ADNc
SEC ID N°: 248 (fase +1)
SEC ID N°: 250 (fase +2)
SEC ID N°: 252 (fase +3)
SEC ID N°: 254 (fase +3)
SEC ID N°: 256 (fase +3)
SEC ID N°: 258 (fase +2)
SEC ID N°: 260 (fase +1)

Tabla 2-EV

ID de diana	Cebador directo 5' → 3'	Cebador inverso 5' → 3'	Secuencia de ADNc (hebra con sentido) 5' → 3'
EV005	SEC ID N°: 523	SEC ID N°: 524	SEC ID N°: 513
EV009	SEC ID N°: 525	SEC ID N°: 526	SEC ID N°: 515
EV010	SEC ID N°: 527	SEC ID N°: 528	SEC ID N°: 517
EV015	SEC ID N°: 529	SEC ID N°: 530	SEC ID N°: 519
EV016	SEC ID N°: 531	SEC ID N°: 532	SEC ID N°: 521

Tabla 3-EV

Secuencia de aminoácidos correspondiente de clon de ADNc
SEC ID N°: 514 (fase +3)
SEC ID N°: 516 (fase +1)
SEC ID N°: 518 (fase +3)
SEC ID N°: 520 (fase +1)
SEC ID N°: 522 (fase +2)

Tabla 2-AG

ID de diana	Cebador directo 5' → 3'	Cebador inverso 5' → 3'	Secuencia de ADNc (hebra con sentido) 5' → 3'
AG001	SEC ID N°: 611	SEC ID N°: 612	SEC ID N°: 601
AG005	SEC ID N°: 613	SEC ID N°: 614	SEC ID N°: 603
AG010	SEC ID N°: 615	SEC ID N°: 616	SEC ID N°: 605
AG014	SEC ID N°: 617	SEC ID N°: 618	SEC ID N°: 607
AG016	SEC ID N°: 619	SEC ID N°: 620	SEC ID N°: 609

Tabla 2-TC

ID de diana	Cebador directo 5' → 3'	Cebador inverso 5' → 3'	Secuencia de ADNc (hebra con sentido) 5' → 3'
TC001	SEC ID N°: 803	SEC ID N°: 804	SEC ID N°: 793
TC002	SEC ID N°: 805	SEC ID N°: 806	SEC ID N°: 795
TC010	SEC ID N°: 807	SEC ID N°: 808	SEC ID N°: 797
TC014	SEC ID N°: 809	SEC ID N°: 810	SEC ID N°: 799
TC015	SEC ID N°: 811	SEC ID N°: 812	SEC ID N°: 801

Tabla 2-MP

ID de diana	Cebador directo 5' → 3'	Cebador inverso 5' → 3'	Secuencia de ADNc (hebra con sentido) 5' → 3'
MP001	SEC ID N°: 898	SEC ID N°: 899	SEC ID N°: 888
MP002	SEC ID N°: 900	SEC ID N°: 901	SEC ID N°: 890
MP010	SEC ID N°: 902	SEC ID N°: 903	SEC ID N°: 892
MP016	SEC ID N°: 904	SEC ID N°: 905	SEC ID N°: 894
MP027	SEC ID N°: 906	SEC ID N°: 907	SEC ID N°: 896

Tabla 2-NL

ID de diana	Cebador directo 5' → 3'	Cebador inverso 5' → 3'	Secuencia de ADNc (hebra con sentido) 5' → 3'
NL001	SEC ID N°: 1117	SEC ID N°: 1118	SEC ID N°: 1071
NL002	SEC ID N°: 1119	SEC ID N°: 1120	SEC ID N°: 1073
NL003	SEC ID N°: 1121	SEC ID N°: 1122	SEC ID N°: 1075
NL004	SEC ID N°: 1123	SEC ID N°: 1124	SEC ID N°: 1077
NL005	SEC ID N°: 1125	SEC ID N°: 1126	SEC ID N°: 1079
NL006	SEC ID N°: 1127	SEC ID N°: 1128	SEC ID N°: 1081
NL007	SEC ID N°: 1129	SEC ID N°: 1130	SEC ID N°: 1083
NL008	SEC ID N°: 1131	SEC ID N°: 1132	SEC ID N°: 1085
NL009	SEC ID N°: 1133	SEC ID N°: 1134	SEC ID N°: 1087
NL010	SEC ID N°: 1135	SEC ID N°: 1136	SEC ID N°: 1089 (extremo amino terminal) SEC ID N°: 1115 (extremo C terminal)
NL011	SEC ID N°: 1137	SEC ID N°: 1138	SEC ID N°: 1091
NL012	SEC ID N°: 1139	SEC ID N°: 1140	SEC ID N°: 1093
NL013	SEC ID N°: 1141	SEC ID N°: 1142	SEC ID N°: 1095
NL014	SEC ID N°: 1143	SEC ID N°: 1144	SEC ID N°: 1097
NL015	SEC ID N°: 1145	SEC ID N°: 1146	SEC ID N°: 1099
NL016	SEC ID N°: 1147	SEC ID N°: 1148	SEC ID N°: 1101
NL018	SEC ID N°: 1149	SEC ID N°: 1150	SEC ID N°: 1103
NL019	SEC ID N°: 1151	SEC ID N°: 1152	SEC ID N°: 1105
NL021	SEC ID N°: 1153	SEC ID N°: 1154	SEC ID N°: 1107
NL022	SEC ID N°: 1155	SEC ID N°: 1156	SEC ID N°: 1109

Tabla 3-AG

Secuencia de aminoácidos correspondiente de clon de ADNc
SEC ID N°: 602 (fase +1)
SEC ID N°: 604 (fase +2)
SEC ID N°: 606 (fase +3)
SEC ID N°: 608 (fase +3)
SEC ID N°: 610 (fase +1)

Tabla 3-TC

Secuencia de aminoácidos correspondiente de clon de ADNc
SEC ID N°: 794 (fase +1)
SEC ID N°: 796 (fase +1)
SEC ID N°: 798 (fase +3)
SEC ID N°: 800 (fase +1)
SEC ID N°: 802 (fase +2)

Tabla 3-MP

Secuencia de aminoácidos correspondiente de clon de ADNc
SEC ID N°: 889 (fase +1)
SEC ID N°: 891 (fase +2)
SEC ID N°: 893 (fase +3)
SEC ID N°: 895 (fase +1)
SEC ID N°: 897 (fase +3)

Tabla 3-NL

Secuencia de aminoácidos correspondiente de clon de ADNc
SEC ID N°: 1072 (fase +2)
SEC ID N°: 1074 (fase +1)
SEC ID N°: 1076 (fase +2)
SEC ID N°: 1078 (fase +1)
SEC ID N°: 1080 (fase +1)
SEC ID N°: 1082 (fase +3)
SEC ID N°: 1084 (fase +2)
SEC ID N°: 1086 (fase +1)
SEC ID N°: 1088 (fase +1)
SEC ID N°: 1090 (extremo amino terminal) (fase +2)
SEC ID N°: 1116 (extremo carboxilo terminal) (fase +3)
SEC ID N°: 1092 (fase +2)
SEC ID N°: 1094 (fase +2)
SEC ID N°: 1096 (fase +2)
SEC ID N°: 1098 (fase +2)
SEC ID N°: 1100 (fase +1)
SEC ID N°: 1102 (fase +2)
SEC ID N°: 1104 (fase +2)
SEC ID N°: 11,06 (fase +2)
SEC ID N°: 1108 (fase +2)
SEC ID N°: 1110 (fase +2)

ID de diana	Cebador directo 5' → 3'	Cebador inverso 5' → 3'	Secuencia de ADNc (hebra con sentido) 5' → 3'
NL023	SEC ID N°: 1157	SEC ID N°: 1158	SEC ID N°: 1111
NL027	SEC ID N°: 1159	SEC ID N°: 1160	SEC ID N°: 1113

Secuencia de aminoácidos correspondiente de clon de ADNc
SEC ID N°: 1112 (fase +2)
SEC ID N°: 1114 (fase +2)

Tabla 2-CS

ID de diana	Cebador directo 5' → 3'	Cebador inverso 5' → 3'	Secuencia de ADNc (hebra con sentido) 5' → 3'
CS001	SEC ID N°: 1706	SEC ID N°: 1707	SEC ID N°: 1682
CS002	SEC ID N°: 1708	SEC ID N°: 1709	SEC ID N°: 1684
CS003	SEC ID N°: 1710	SEC ID N°: 1711	SEC ID N°: 1686
CS006	SEC ID N°: 1712	SEC ID N°: 1713	SEC ID N°: 1688
CS007	SEC ID N°: 1714	SEC ID N°: 1715	SEC ID N°: 1690
CS009	SEC ID N°: 1716	SEC ID N°: 1717	SEC ID N°: 1692
CS011	SEC ID N°: 1718	SEC ID N°: 1719	SEC ID N°: 1694
CS013	SEC ID N°: 1720	SEC ID N°: 1721	SEC ID N°: 1696
CS014	SEC ID N°: 1722	SEC ID N°: 1723	SEC ID N°: 1698
CS015	SEC ID N°: 1724	SEC ID N°: 1725	SEC ID N°: 1700
CS016	SEC ID N°: 1726	SEC ID N°: 1727	SEC ID N°: 1702
CS018	SEC ID N°: 1728	SEC ID N°: 1729	SEC ID N°: 1704

Tabla 3-CS

Secuencia de aminoácidos correspondiente de clon de ADNc
SEC ID N°: 1683 (fase +1)
SEC ID N°: 1685 (fase +1)
SEC ID N°: 1687 (fase +1)
SEC ID N°: 1689 (fase +1)
SEC ID N°: 1691 (fase +3)
SEC ID N°: 1693 (fase +1)
SEC ID N°: 1695 (fase +1)
SEC ID N°: 1697 (fase +2)
SEC ID N°: 1699 (fase +2)
SEC ID N°: 1701 (fase +1)
SEC ID N°: 1703 (fase -3)
SEC ID N°: 1705 (fase +2)

Tabla 2-PX

ID de diana	Cebador directo 5' → 3'	Cebador inverso 5' → 3'	Secuencia de ADNc (hebra con sentido) 5' → 3'
PX001	SEC ID N°: 2110	SEC ID N°: 2111	SEC ID N°: 2100
PX009	SEC ID N°: 2112	SEC ID N°: 2113	SEC ID N°: 2102
PX010	SEC ID N°: 2114	SEC ID N°: 2115	SEC ID N°: 2104
PX015	SEC ID N°: 2116	SEC ID N°: 2117	SEC ID N°: 2106
PX016	SEC ID N°: 2118	SEC ID N°: 2119	SEC ID N°: 2108

Tabla 3-PX

Secuencia de aminoácidos correspondiente de clon de ADNc
SEC ID N°: 2101 (fase +1)
SEC ID N°: 2103 (fase +3)
SEC ID N°: 2105 (fase +3)
SEC ID N°: 2107 (fase +3)
SEC ID N°: 2109 (fase +2)

Tabla 2-AD

ID de diana	Cebador directo 5' → 3'	Cebador inverso 5' → 3'	Secuencia de ADNc (hebra con sentido) 5' → 3'
AD001	SEC ID N°: 2374	SEC ID N°: 2375	SEC ID N°: 2364
AD002	SEC ID N°: 2376	SEC ID N°: 2377	SEC ID N°: 2366
AD009	SEC ID N°: 2378	SEC ID N°: 2379	SEC ID N°: 2368
AD015	SEC ID N°: 2380	SEC ID N°: 2381	SEC ID N°: 2370
AD016	SEC ID N°: 2382	SEC ID N°: 2383	SEC ID N°: 2372

Tabla 3-AD

Secuencia de aminoácidos correspondiente de clon de ADNc
SEC ID N°: 2365 (fase +1)
SEC ID N°: 2367 (fase +2)
SEC ID N°: 2369 (fase +3)
SEC ID N°: 2371 (fase +2)
SEC ID N°: 2373 (fase +2)

Tabla 4-LD/MP/NL

ID de diana	SEC ID N°	N° de Ejemplo Gi y especie
LD027	121	66501387 (Apis mellifera)
LD027	122	77326476 (Chironomus tentans)
LD027	123	90129719 (Bicyclus anynana)
MP027	1010	47522167 (Acyrtosiphon pisum)
NL027	1437	49543279 (Rhipicephalus appendiculatus)

Tabla 5-MP

ID de diana	SEC ID N°	N° de Ejemplo Gi y especie
MP027	1023	27540724 (Meloiodogyne hapla)
MP027	1024	34026304 (Meloiodogyne arenaria)
MP027	1025	34028558 (Meloiodogyne javanica)

Tabla 6-LD/MP

ID de diana	SEC ID N°	N° de Ejemplo Gi y especie
LD027	157	90546087 (Gloeophyllum trabeum)
LD027	158	50292600 (Candida glabrata CBS 138)
MP027	1040	60673889 (Alternaria brassicicola)

Tabla 8-LD

ID de diana	Cebadores directos 5' → 3'	Cebadores inversos 5' → 3'	Secuencia de ADN de ARNbc (hebra con sentido) 5' → 3'
LD001	SEC ID N°: 164 SEC ID N°: 166	SEC ID N°: 165 SEC ID N°: 167	SEC ID N°: 163
LD002	SEC ID N°: 169 SEC ID N°: 171	SEC ID N°: 170 SEC ID N°: 172	SEC ID N°: 168
LD003	SEC ID N°: 174 SEC ID N°: 176	SEC ID N°: 175 SEC ID N°: 177	SEC ID N°: 173
LD006	SEC ID N°: 179 SEC ID N°: 181	SEC ID N°: 180 SEC ID N°: 182	SEC ID N°: 178
LD007	SEC ID N°: 184 SEC ID N°: 186	SEC ID N°: 185 SEC ID N°: 187	SEC ID N°: 183
LD010	SEC ID N°: 189 SEC ID N°: 191	SEC ID N°: 190 SEC ID N°: 192	SEC ID N°: 188
LD011	SEC ID N°: 194 SEC ID N°: 196	SEC ID N°: 195 SEC ID N°: 197	SEC ID N°: 193
LD014	SEC ID N°: 199 SEC ID N°: 201	SEC ID N°: 200 SEC ID N°: 202	SEC ID N°: 198
LD014_F1	SEC ID N°: 204 SEC ID N°: 206	SEC ID N°: 205 SEC ID N°: 207	SEC ID N°: 203
LD014_F2	SEC ID N°: 209 SEC ID N°: 211	SEC ID N°: 210 SEC ID N°: 212	SEC ID N°: 208
LD014_C1			SEC ID N°: 213
LD014_C2			SEC ID N°: 214
LD015	SEC ID N°: 216 SEC ID N°: 218	SEC ID N°: 217 SEC ID N°: 219	SEC ID N°: 215
LD016	SEC ID N°: 221 SEC ID N°: 223	SEC ID N°: 222 SEC ID N°: 224	SEC ID N°: 220
LD018	SEC ID N°: 226 SEC ID N°: 228	SEC ID N°: 227 SEC ID N°: 229	SEC ID N°: 225
LD027	SEC ID N°: 231 SEC ID N°: 233	SEC ID N°: 232 SEC ID N°: 234	SEC ID N°: 230
gfp	SEC ID N°: 236 SEC ID N°: 238	SEC ID N°: 237 SEC ID N°: 239	SEC ID N°: 235

Tabla 8-PC

ID de diana	Cebadores directos 5' → 3'	Cebadores inversos 5' → 3'	Secuencia de ADN de ARNbc (hebra con sentido) 5' → 3'
PC001	SEC ID N°: 474 SEC ID N°: 476	SEC ID N°: 475 SEC ID N°: 477	SEC ID N°: 473
PC003	SEC ID N°: 479 SEC ID N°: 481	SEC ID N°: 480 SEC ID N°: 482	SEC ID N°: 478
PC005	SEC ID N°: 484 SEC ID N°: 486	SEC ID N°: 485 SEC ID N°: 487	SEC ID N°: 483

ID de diana	Cebadores directos 5' → 3'	Cebadores inversos 5' → 3'	Secuencia de ADN de ARNbc (hebra con sentido) 5' → 3'
PC010	SEC ID N°: 489 SEC ID N°: 491	SEC ID N°: 490 SEC ID N°: 492	SEC ID N°: 488
PC014	SEC ID N°: 494 SEC ID N°: 496	SEC ID N°: 495 SEC ID N°: 497	SEC ID N°: 493
PC016	SEC ID N°: 499 SEC ID N°: 501	SEC ID N°: 500 SEC ID N°: 502	SEC ID N°: 498
PC027	SEC ID N°: 504 SEC ID N°: 506	SEC ID N°: 505 SEC ID N°: 507	SEC ID N°: 503

Tabla 8-EV

ID de diana	Cebadores directos 5' → 3'	Cebadores inversos 5' → 3'	Secuencia de ADN de ARNbc (hebra con sentido) 5' → 3'
EV005	SEC ID N°: 577 SEC ID N°: 579	SEC ID N°: 578 SEC ID N°: 580	SEC ID N°: 576
EV009	SEC ID N°: 582 SEC ID N°: 584	SEC ID N°: 583 SEC ID N°: 585	SEC ID N°: 581
EV010	SEC ID N°: 587 SEC ID N°: 589	SEC ID N°: 588 SEC ID N°: 590	SEC ID N°: 586
EV015	SEC ID N°: 592 SEC ID N°: 594	SEC ID N°: 593 SEC ID N°: 595	SEC ID N°: 591
EV016	SEC ID N°: 597 SEC ID N°: 599	SEC ID N°: 598 SEC ID N°: 600	SEC ID N°: 596

Tabla 8-AG

ID de diana	Cebadores directos 5' → 3'	Cebadores inversos 5' → 3'	Secuencia de ADN de ARNbc (hebra con sentido) 5' → 3'
AG001	SEC ID N°: 769 SEC ID N°: 771	SEC ID N°: 770 SEC ID N°: 772	SEC ID N°: 768
AG005	SEC ID N°: 774 SEC ID N°: 776	SEC ID N°: 775 SEC ID N°: 777	SEC ID N°: 773
AG010	SEC ID N°: 779 SEC ID N°: 781	SEC ID N°: 780 SEC ID N°: 782	SEC ID N°: 778
AG014	SEC ID N°: 784 SEC ID N°: 786	SEC ID N°: 785 SEC ID N°: 787	SEC ID N°: 783
AG016	SEC ID N°: 789 SEC ID N°: 791	SEC ID N°: 790 SEC ID N°: 792	SEC ID N°: 788

Tabla 8-TC

ID de diana	Cebadores directos 5' → 3'	Cebadores inversos 5' → 3'	Secuencia de ADN de ARNbc (hebra con sentido) 5' → 3'
TC001	SEC ID N°: 864 SEC ID N°: 866	SEC ID N°: 865 SEC ID N°: 867	SEC ID N°: 863
TC002	SEC ID N°: 869 SEC ID N°: 871	SEC ID N°: 870 SEC ID N°: 872	SEC ID N°: 868
TC010	SEC ID N°: 874 SEC ID N°: 876	SEC ID N°: 875 SEC ID N°: 877	SEC ID N°: 873
TC014	SEC ID N°: 879 SEC ID N°: 881	SEC ID N°: 880 SEC ID N°: 882	SEC ID N°: 878
TC015	SEC ID N°: 884 SEC ID N°: 886	SEC ID N°: 885 SEC ID N°: 887	SEC ID N°: 883

Tabla 8-MP

ID de diana	Cebadores directos 5' → 3'	Cebadores inversos 5' → 3'	Secuencia de ADN de ARNbc (hebra con sentido) 5' → 3'
MP001	SEC ID N°: 1042 SEC ID N°: 1044	SEC ID N°: 1043 SEC ID N°: 1045	SEC ID N°: 1041
MP002	SEC ID N°: 1047 SEC ID N°: 1049	SEC ID N°: 1048 SEC ID N°: 1050	SEC ID N°: 1046
MP010	SEC ID N°: 1052 SEC ID N°: 1054	SEC ID N°: 1053 SEC ID N°: 1055	SEC ID N°: 1051

MP016	SEC ID Nº: 1057 SEC ID Nº: 1059	SEC ID Nº: 1058 SEC ID Nº: 1060	SEC ID Nº: 1056
MP027	SEC ID Nº: 1062 SEC ID Nº: 1064	SEC ID Nº: 1063 SEC ID Nº: 1065	SEC ID Nº: 1061

Tabla 8-NL

ID de diana	Cebadores directos 5' → 3'	Cebadores inversos 5' → 3'	Secuencia de ADN de ARNbc 5' → 3'
NL001	SEC ID Nº: 1573 SEC ID Nº: 1575	SEC ID Nº: 1574 SEC ID Nº: 1576	SEC ID Nº: 1572
NL002	SEC ID Nº: 1578 SEC ID Nº: 1580	SEC ID Nº: 1579 SEC ID Nº: 1581	SEC ID Nº: 1577
NL003	SEC ID Nº: 1583 SEC ID Nº: 1585	SEC ID Nº: 1584 SEC ID Nº: 1586	SEC ID Nº: 1582
NL004	SEC ID Nº: 1588 SEC ID Nº: 1590	SEC ID Nº: 1589 SEC ID Nº: 1591	SEC ID Nº: 1587
NL005	SEC ID Nº: 1593 SEC ID Nº: 1595	SEC ID Nº: 1594 SEC ID Nº: 1596	SEC ID Nº: 1592
NL006	SEC ID Nº: 1598 SEC ID Nº: 1600	SEC ID Nº: 1599 SEC ID Nº: 1601	SEC ID Nº: 1597
NL007	SEC ID Nº: 1603 SEC ID Nº: 1605	SEC ID Nº: 1604 SEC ID Nº: 1606	SEC ID Nº: 1602
NL008	SEC ID Nº: 1608 SEC ID Nº: 1610	SEC ID Nº: 1609 SEC ID Nº: 1611	SEC ID Nº: 1607
NL009	SEC ID Nº: 1613 SEC ID Nº: 1615	SEC ID Nº: 1614 SEC ID Nº: 1616	SEC ID Nº: 1612
NL010	SEC ID Nº: 1618 SEC ID Nº: 1620	SEC ID Nº: 1619 SEC ID Nº: 1621	SEC ID Nº: 1617
NL011	SEC ID Nº: 1623 SEC ID Nº: 1625	SEC ID Nº: 1624 SEC ID Nº: 1626	SEC ID Nº: 1622
NL012	SEC ID Nº: 1628 SEC ID Nº: 1630	SEC ID Nº: 1629 SEC ID Nº: 1631	SEC ID Nº: 1627
NL013	SEC ID Nº: 1633 SEC ID Nº: 1635	SEC ID Nº: 1634 SEC ID Nº: 1636	SEC ID Nº: 1632
NL014	SEC ID Nº: 1638 SEC ID Nº: 1640	SEC ID Nº: 1639 SEC ID Nº: 1641	SEC ID Nº: 1637
NL015	SEC ID Nº: 1643 SEC ID Nº: 1645	SEC ID Nº: 1644 SEC ID Nº: 1646	SEC ID Nº: 1642
NL016	SEC ID Nº: 1648 SEC ID Nº: 1650	SEC ID Nº: 1649 SEC ID Nº: 1651	SEC ID Nº: 1647
NL018	SEC ID Nº: 1653 SEC ID Nº: 1655	SEC ID Nº: 1654 SEC ID Nº: 1656	SEC ID Nº: 1652
NL019	SEC ID Nº: 1658 SEC ID Nº: 1660	SEC ID Nº: 1659 SEC ID Nº: 1661	SEC ID Nº: 1657
NL021	SEC ID Nº: 1663 SEC ID Nº: 1665	SEC ID Nº: 1664 SEC ID Nº: 1666	SEC ID Nº: 1662
NL022	SEC ID Nº: 1668 SEC ID Nº: 1670	SEC ID Nº: 1669 SEC ID Nº: 1671	SEC ID Nº: 1667
NL023	SEC ID Nº: 1673 SEC ID Nº: 1675	SEC ID Nº: 1674 SEC ID Nº: 1676	SEC ID Nº: 1672
NL027	SEC ID Nº: 1678 SEC ID Nº: 1680	SEC ID Nº: 1679 SEC ID Nº: 1681	SEC ID Nº: 1677

Tabla 8-CS

ID de diana	Cebadores directos 5' → 3'	Cebadores inversos 5' → 3'	Secuencia de ADN de ARNbc (hebra con sentido) 5' → 3'
CS001	SEC ID Nº: 2041 SEC ID Nº: 2043	SEC ID Nº: 2042 SEC ID Nº: 2044	SEC ID Nº: 2040
CS002	SEC ID Nº: 2046 SEC ID Nº: 2048	SEC ID Nº: 2047 SEC ID Nº: 2049	SEC ID Nº: 2045
CS003	SEC ID Nº: 2051 SEC ID Nº: 2053	SEC ID Nº: 2052 SEC ID Nº: 2054	SEC ID Nº: 2050
CS006	SEC ID Nº: 2056	SEC ID Nº: 2057	SEC ID Nº: 2055

	SEC ID N°: 2058	SEC ID N°: 2059	
CS007	SEC ID N°: 2061 SEC ID N°: 2063	SEC ID N°: 2062 SEC ID N°: 2064	SEC ID N°: 2060
CS009	SEC ID N°: 2066 SEC ID N°: 2068	SEC ID N°: 2067 SEC ID N°: 2069	SEC ID N°: 2065
CS011	SEC ID N°: 2071 SEC ID N°: 2073	SEC ID N°: 2072 SEC ID N°: 2074	SEC ID N°: 2070
CS013	SEC ID N°: 2076 SEC ID N°: 2078	SEC ID N°: 2077 SEC ID N°: 2079	SEC ID N°: 2075
CS014	SEC ID N°: 2081 SEC ID N°: 2083	SEC ID N°: 2082 SEC ID N°: 2084	SEC ID N°: 2080
CS015	SEC ID N°: 2086 SEC ID N°: 2088	SEC ID N°: 2087 SEC ID N°: 2089	SEC ID N°: 2085
CS016	SEC ID N°: 2091 SEC ID N°: 2093	SEC ID N°: 2092 SEC ID N°: 2094	SEC ID N°: 2090
CS018	SEC ID N°: 2096 SEC ID N°: 2098	SEC ID N°: 2097 SEC ID N°: 2099	SEC ID N°: 2095

Tabla 8-PX

ID de diana	Cebadores directos 5' → 3'	Cebadores inversos 5' → 3'	Secuencia de ADN de ARNbc (hebra con sentido) 5' → 3'
PX001	SEC ID N°: 2340 SEC ID N°: 2342	SEC ID N°: 2341 SEC ID N°: 2343	SEC ID N°: 2339
PX009	SEC ID N°: 2345 SEC ID N°: 2347	SEC ID N°: 2346 SEC ID N°: 2348	SEC ID N°: 2344
PX010	SEC ID N°: 2350 SEC ID N°: 2352	SEC ID N°: 2351 SEC ID N°: 2353	SEC ID N°: 2349
PX015	SEC ID N°: 2355 SEC ID N°: 2357	SEC ID N°: 2356 SEC ID N°: 2358	SEC ID N°: 2354
PX016	SEC ID N°: 2360 SEC ID N°: 2362	SEC ID N°: 2361 SEC ID N°: 2363	SEC ID N°: 2359

Tabla 8-AD

ID de diana	Cebadores directos 5' → 3'	Cebadores inversos 5' → 3'	Secuencia de ADN de ARNbc (hebra con sentido) 5' → 3'
AD001	SEC ID N°: 2462 SEC ID N°: 2464	SEC ID N°: 2463 SEC ID N°: 2465	SEC ID N°: 2461
AD002	SEC ID N°: 2467 SEC ID N°: 2469	SEC ID N°: 2468 SEC ID N°: 2470	SEC ID N°: 2466
AD009	SEC ID N°: 2472 SEC ID N°: 2474	SEC ID N°: 2473 SEC ID N°: 2475	SEC ID N°: 2471
AD015	SEC ID N°: 2477 SEC ID N°: 2479	SEC ID N°: 2478 SEC ID N°: 2480	SEC ID N°: 2476
AD016	SEC ID N°: 2482 SEC ID N°: 2484	SEC ID N°: 2483 SEC ID N°: 2485	SEC ID N°: 2481

Tabla 10-LD

Bioensayo	Cepa hospedadora bacteriana	Tratamiento	N° de supervivientes	Peso total	Peso promedio/larva
I	AB309-105	solamente dieta	8*	1,0245	0,1281
		pGN29	8*	1,0124	0,1266
		pGBNJ003 clon 1	4	0,0273	0,0068
		pGBNJ003 clon 2	1	0,0091	0,0091
		pGBNJ003 clon 3	25	0,7113	0,0285
		pGBNJ003 clon 4	12	0,1379	0,0115
		pGBNJ003 clon 5	12	0,1808	0,0151
II	BL21 (DE3)	solamente dieta	8*	1,0435	0,1304
		pGN29	8*	1,1258	0,1407
		pGBNJ003 clon 1	33	0,5879	0,0178
		pGBNJ003 clon 2	42	0,8034	0,0191
		pGBNJ003 clon 3	33	0,3441	0,0104
		pGBNJ003 clon 4	21	0,1738	0,0083

		pGBNJ003 clon 5	33	0,3628	0,0120
--	--	-----------------	----	--------	--------

Tablas 10(a)-NL

ARNi	Media de % de supervivencia (días después del inicio)									Análisis de supervivencia ¹
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
gfp	100	98	90	82	68	60	44	32	20	-
solamente dieta	100	98	96	86	74	68	58	54	38	-
NL002	100	98	90	76	68	34	6	0	0	+
NL003	100	98	74	48	36	22	12	2	0	+
NL005	100	100	74	56	40	20	16	6	4	+
NL010	100	96	74	56	48	30	18	12	8	+

¹ = Los datos se analizaron usando el análisis de curva de supervivencia de Kaplan-Meier

Tablas 10(a)-NL (continuación)

	Chi cuadrado	valor de P	Dif. Sig. ²
dieta frente a:			
NL002	29,06	< 0,0001	Sí
NL003	39,59	< 0,0001	Sí
NL005	29,55	< 0,0001	Sí
NL010	21,04	< 0,0001	Sí
ARNbc de gfp frente a:			
NL002	15,09	0,0001	Sí
NL003	22,87	< 0,0001	Sí
NL005	15,12	< 0,0001	Sí
NL010	8,838	0,0029	Sí
dieta frente a ARNbc de gfp	4,030	0,0447 (~0,05)	No

² alfa < 0,05

5 **Tablas 10(b)-NL**

ARNi	Media de % de supervivencia (días después del inicio)									Análisis de supervivencia ¹
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
gfp	100	96	84	82	76	70	54	50	44	-
solamente dieta	100	96	88	82	76	70	54	50	44	-
NL009	100	94	75	63	42	30	24	22	14	+
NL016	100	94	84	78	54	44	36	18	14	+

¹ = Los datos se analizaron usando el análisis de curva de supervivencia de Kaplan-Meier

	Chi cuadrado	valor de P	Dif. Sig. ²
dieta frente a:			
NL009	11,98	0,0005	Sí
NL016	8,98	0,0027	Sí
ARNbc de gfp frente a:			
NL009	13,69	0,0002	Sí
NL016	11,37	0,0007	Sí
dieta frente a ARNbc de gfp:	0,03317	0,8555	No

² alfa < 0,05

Tablas 10(c)-NL

ARNi	Media de % de supervivencia (días después del inicio)									Análisis de supervivencia ¹
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
gfp	100	92	84	78	72	62	58	56	48	-
solamente dieta	100	84	72	68	64	58	52	42	42	-
NL014	100	86	68	60	46	32	24	18	14	+
NL018	100	82	70	54	40	30	18	14	12	+

¹ = Los datos se analizaron usando el análisis de curva de supervivencia de Kaplan-Meier

	Chi cuadrado	valor de P	Dif. Sig. ²
dieta frente a:			
NL014	8,088	0,0045	Sí
NL018	10,47	0,0012	Sí
ARNbc de gfp frente a:			
NL014	14,55	0,0001	Sí
NL018	17,64	< 0,0001	Sí
dieta frente a ARNbc de gfp:	0,6548	0,4184	No

² alfa < 0,05

Tablas 10(d)-NL

ARNi	Media de % de supervivencia (días después del inicio)										Análisis de supervivencia ¹
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
gfp	100	96	84	84	72	68	68	66	66	62	-
solamente dieta	100	96	86	82	74	72	70	70	66	58	-
NL013	100	94	82	68	50	40	30	28	20	20	+
NL015	100	100	72	30	18	12	8	6	6	6	+
NL021	100	100	84	58	50	44	40	34	34	22	+

¹ = Los datos se analizaron usando el análisis de curva de supervivencia de Kaplan-Meier

5 **Tablas 10(d)-NL (continuación)**

	Chi cuadrado	valor de P	Dif. Sig. ²
dieta frente a:			
NL013	15,73	< 0,0001	Sí
NL015	39,44	< 0,0001	Sí
NL021	12,75	0,0004	Sí
ARNbc de gfp frente a:			
NL013	16,42	< 0,0001	Sí
NL015	39,15	< 0,0001	Sí
NL021	14,1	0,0002	Sí
dieta frente a ARNbc de gfp:	0,1031	0,7481	No

² alfa < 0,05

Tabla 11-NL

ARNi NL002	Media de % de supervivencia (días después del inicio)								Análisis de supervivencia ¹
	0	1	2	3	4	5	6	7	
solamente dieta	100	100	96	90	86	78	78	78	-
1 µg/µl	100	84	80	44	26	8	6	6	+
0,2 µg/µl	100	84	60	12	8	4	2	2	+
0,08 µg/µl	100	84	62	18	14	6	6	6	+
0,04 µg/µl	100	84	48	24	22	22	22	22	+

¹ = Los datos se analizaron usando el análisis de curva de supervivencia de Kaplan-Meier

	Chi cuadrado	valor de P	Dif. Sig. ²
dieta frente a:			
NL002 1 µg/µl	57,53	< 0,0001	Sí
NL002 0,2 µg/µl	74,54	< 0,0001	Sí
NL002 0,08 µg/µl	64	< 0,0001	Sí
NL002 0,04 µg/µl	39,49	< 0,0001	Sí

² alfa < 0,05

REIVINDICACIONES

1. Un ARN bicatenario que comprende hebras complementarias hibridadas, en el que al menos una de dichas hebras comprende un polirribonucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en:
 - (i) polirribonucleótidos complementarios a al menos 21 nucleótidos contiguos de un gen diana representado por cualquiera de las SEC ID N°: 23, 121 a 123, 157, 158, 230, 259, 503, 896, 1010, 1023 a 1025, 1040, 1061, 1113, 1437 y 1677,
 - (ii) polirribonucleótidos complementarios a al menos 21 nucleótidos contiguos de un gen diana que codifica la secuencia de aminoácidos representado por cualquiera de las SEC ID N°: 24, 260, 897 y 1114, y
 - (iii) polirribonucleótidos que tienen al menos un 85 % de identidad de secuencia con los polirribonucleótidos de (i) o (ii).
2. El ARN bicatenario de la reivindicación 1, en el que la ingestión de dicho polirribonucleótido por una plaga de insectos da como resultado la regulación negativa de dicho gen diana.
3. Un polinucleótido aislado que codifica el ARN bicatenario de la reivindicación 1 o 2.
4. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3.
5. Una célula transformada con y que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3.
6. La célula de la reivindicación 5, en la que dicha célula es una célula bacteriana, de levadura o de alga.
7. La célula bacteriana de la reivindicación 6, que se destruye por tratamiento térmico.
8. Un producto alimentario que comprende la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
9. Una composición que comprende un polinucleótido de la reivindicación 3 o un ARN bicatenario de la reivindicación 1 o 2.
10. La composición de la reivindicación 9, en la que dicha composición se selecciona del grupo que consiste en un pulverizador, un polvo, una forma sólida, una forma de pasta, un gránulo, un gel y una cápsula.
11. Un pesticida que comprende un polinucleótido de la reivindicación 3, un ARN bicatenario de la reivindicación 1 o 2, o una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
12. Un método para el control de la infestación por plagas de insectos, que comprende exponer una plaga de insectos a una composición que comprenda el ARN bicatenario de la reivindicación 1 o 2 o una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
13. Un método para proteger un objeto de la infestación por plagas, que comprende exponer a una plaga de insecto a una composición que comprenda el ARN bicatenario de la reivindicación 1 o 2 o una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho objeto se selecciona del grupo que consiste en madera, árboles, cultivos, libros, encuadernaciones, textiles, bolsas para ropa, y envases para almacenar alimento.
15. El uso de un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 3, un ARN bicatenario de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, una composición de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, un pesticida de acuerdo con la reivindicación 11, para la prevención o el tratamiento de una infestación por insectos.

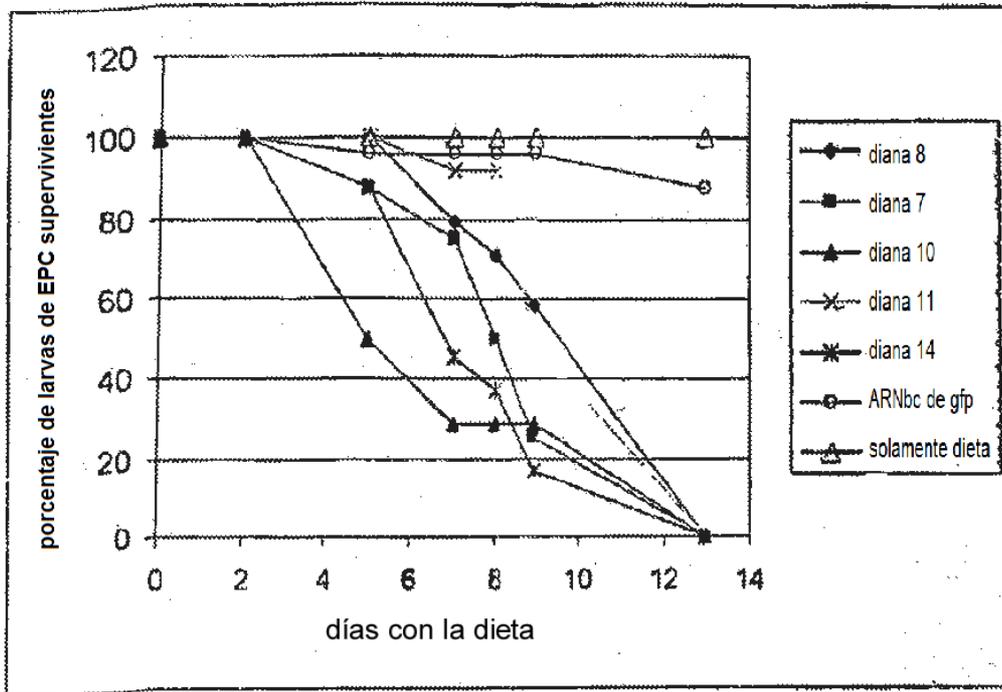


FIGURA 1-LD

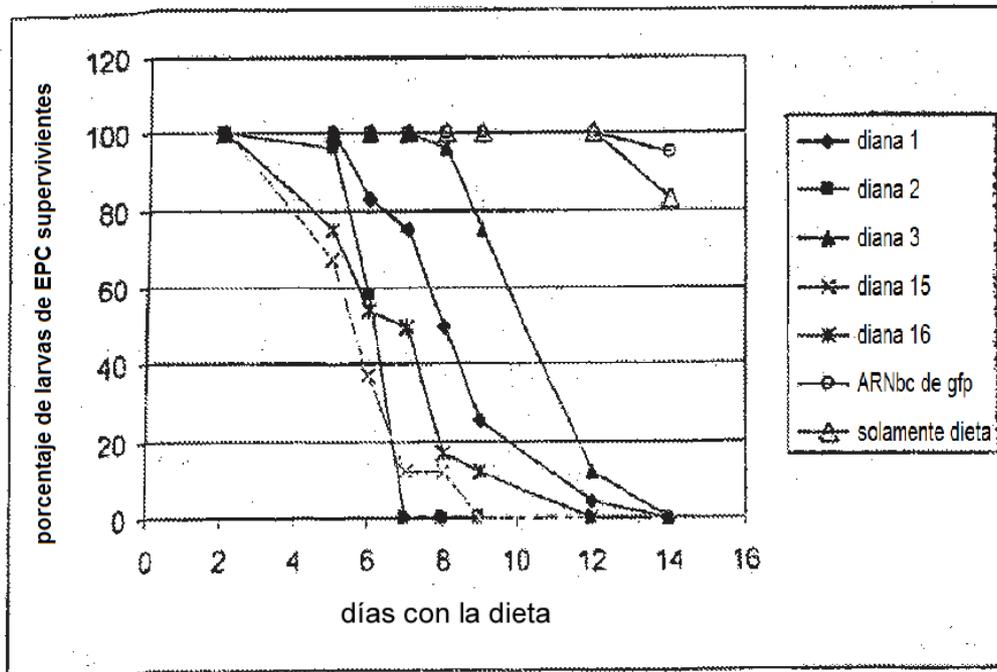


FIGURA 2-LD

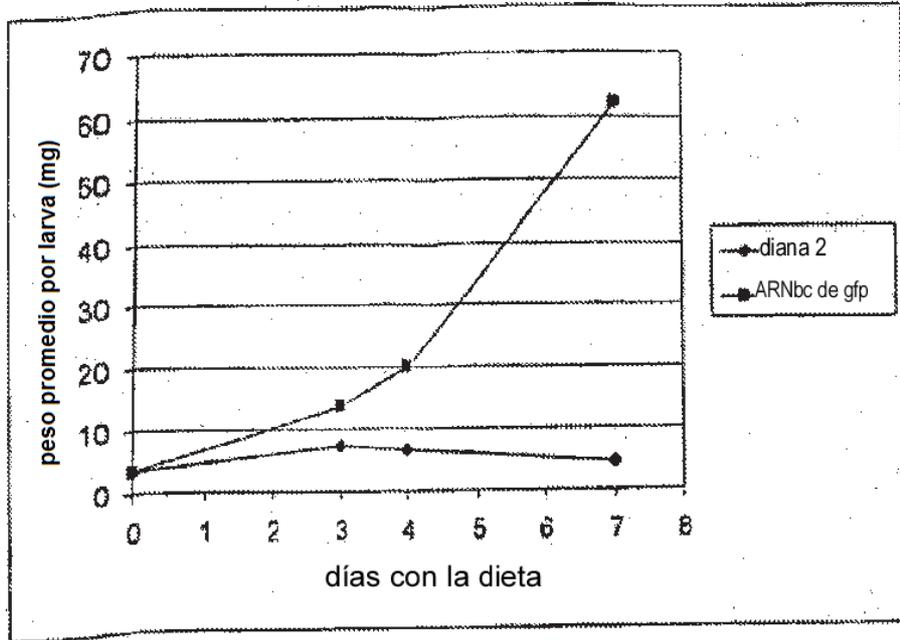


FIGURA 3-LD

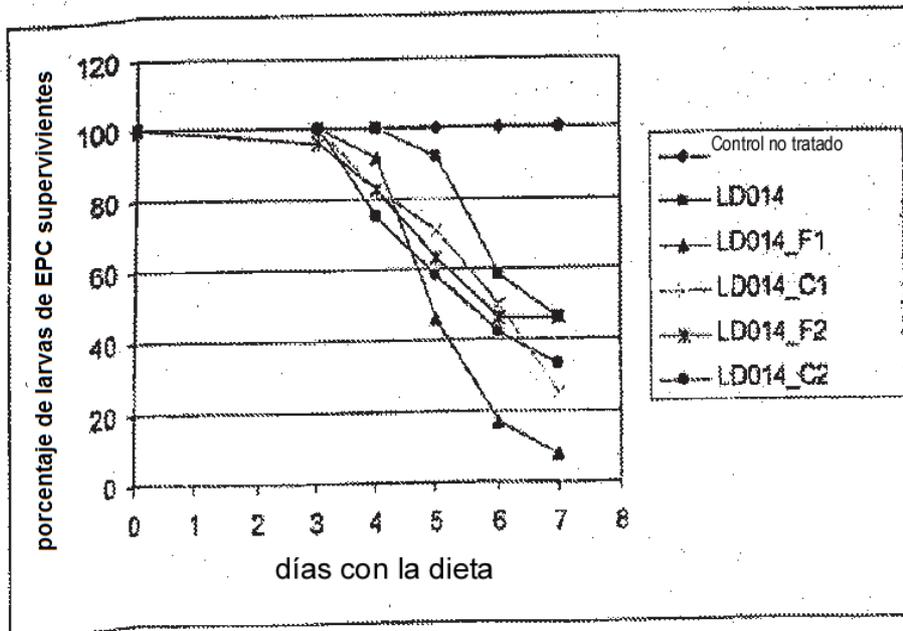


FIGURA 4-LD

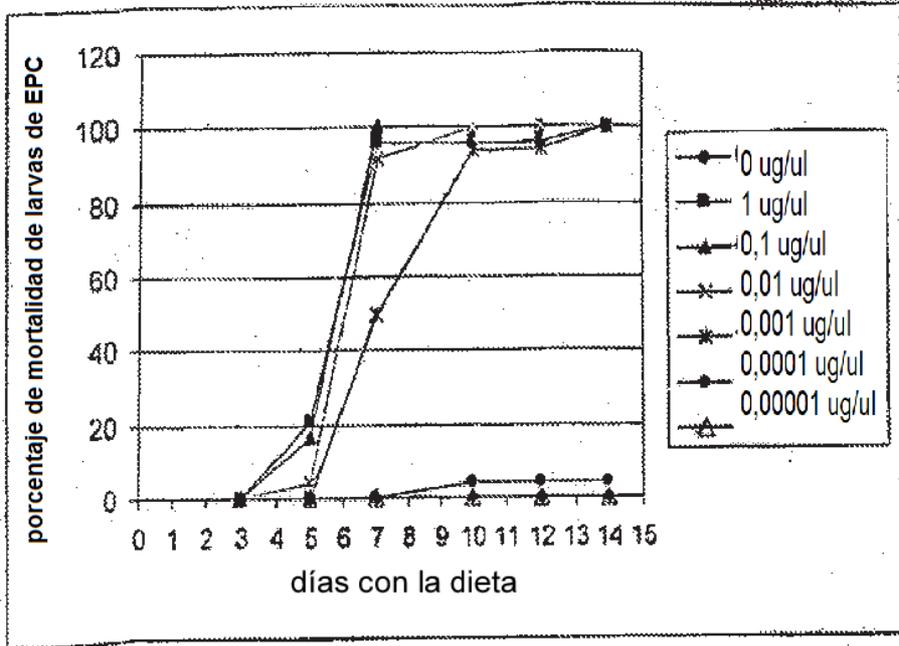


FIGURA 5(a)-LD

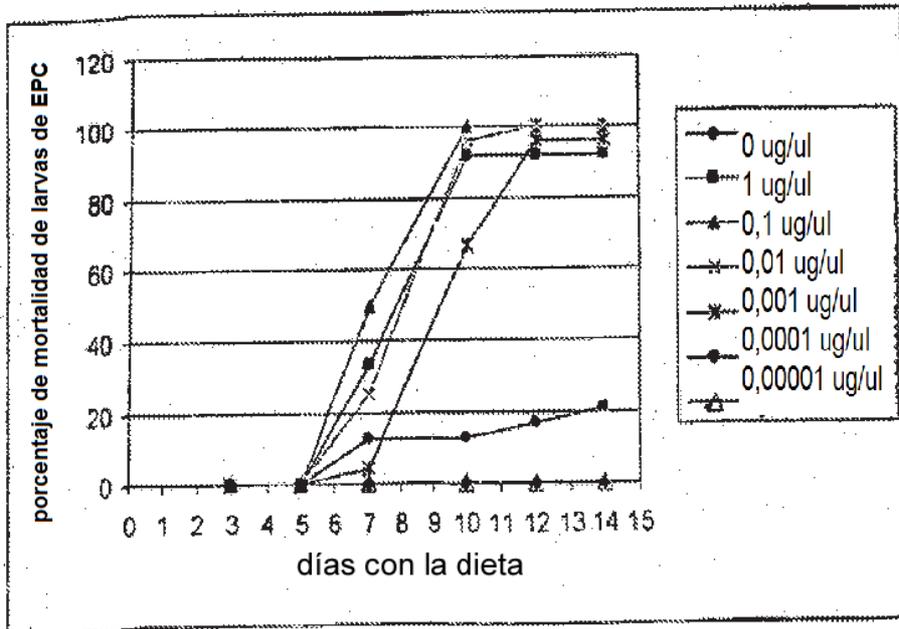


FIGURA 5(b)-LD

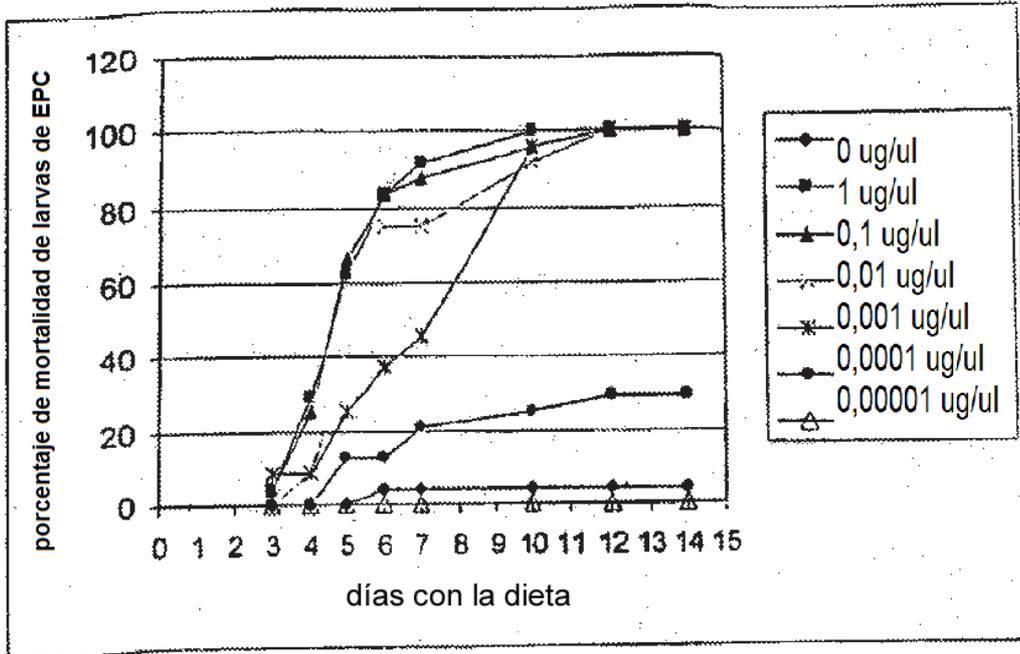


FIGURA 5(c)-LD

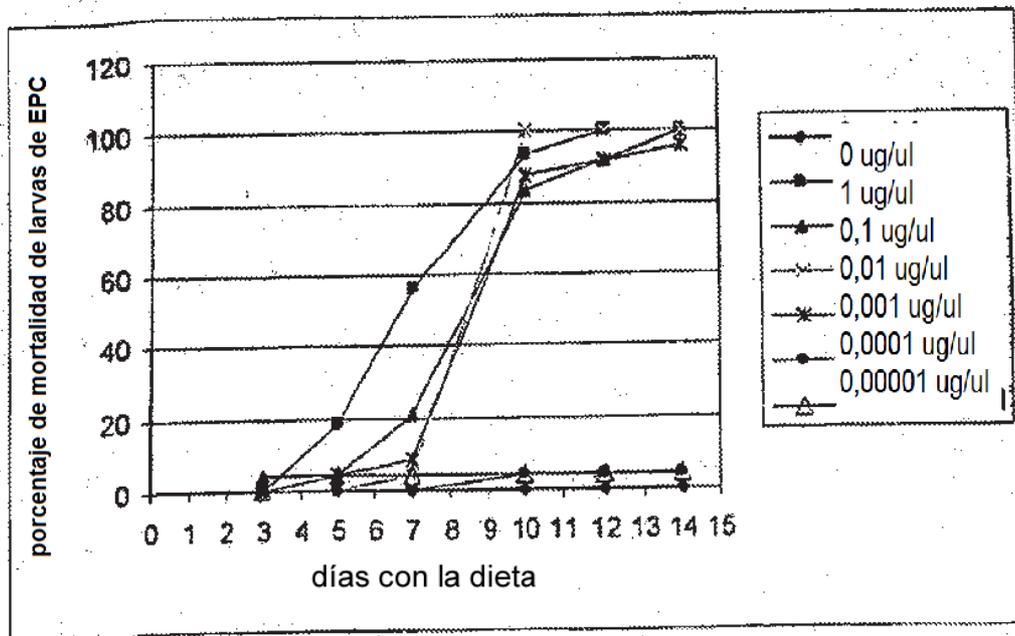


FIGURA 5(d)-LD

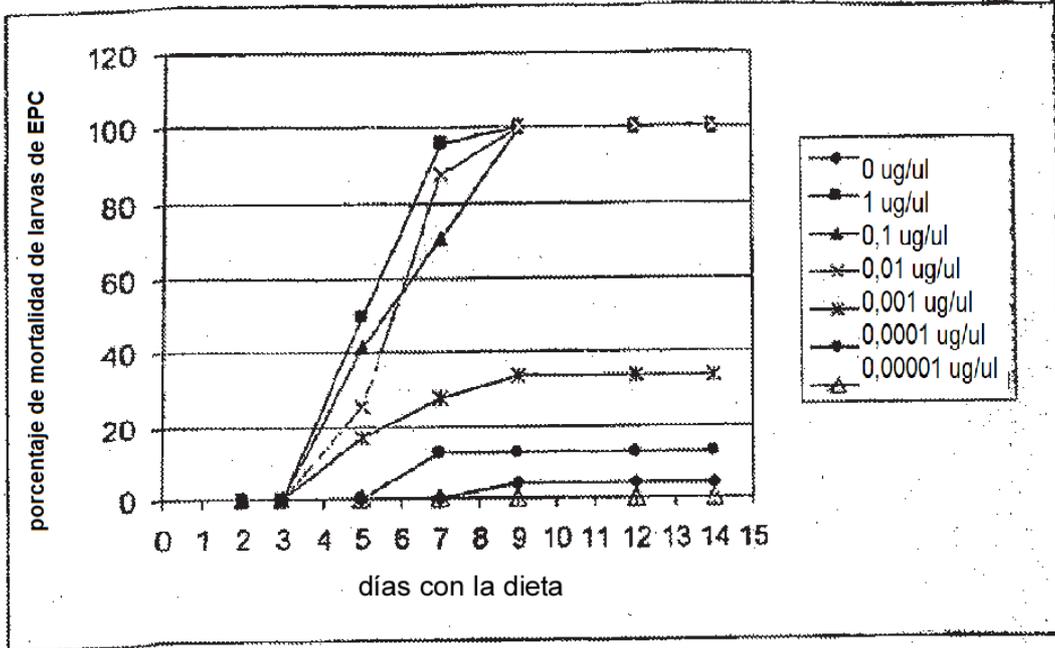


FIGURA 5(e)-LD

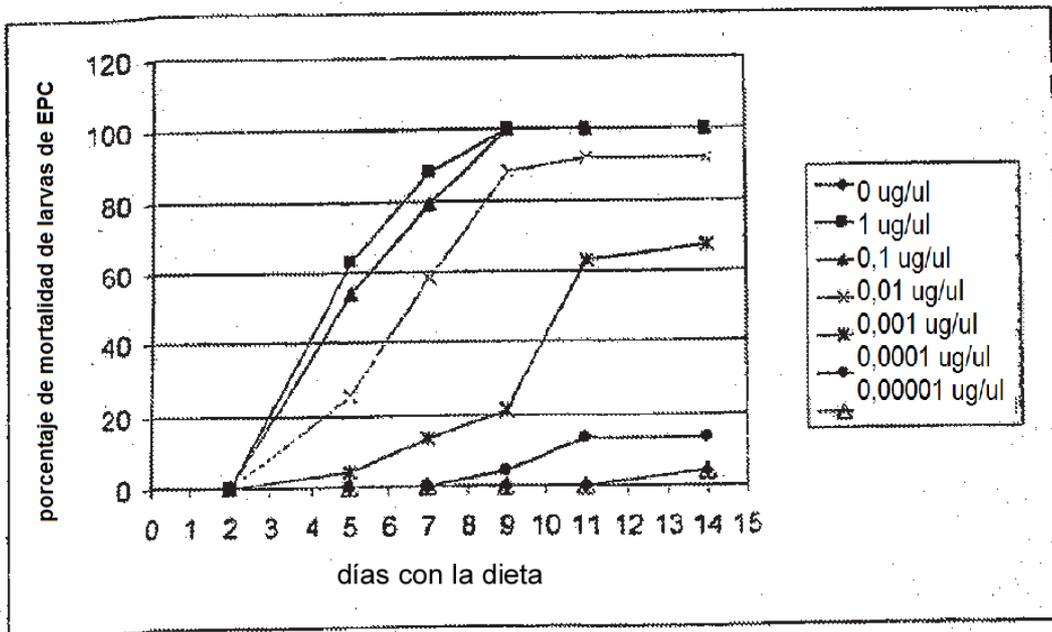


FIGURA 5(f)-LD

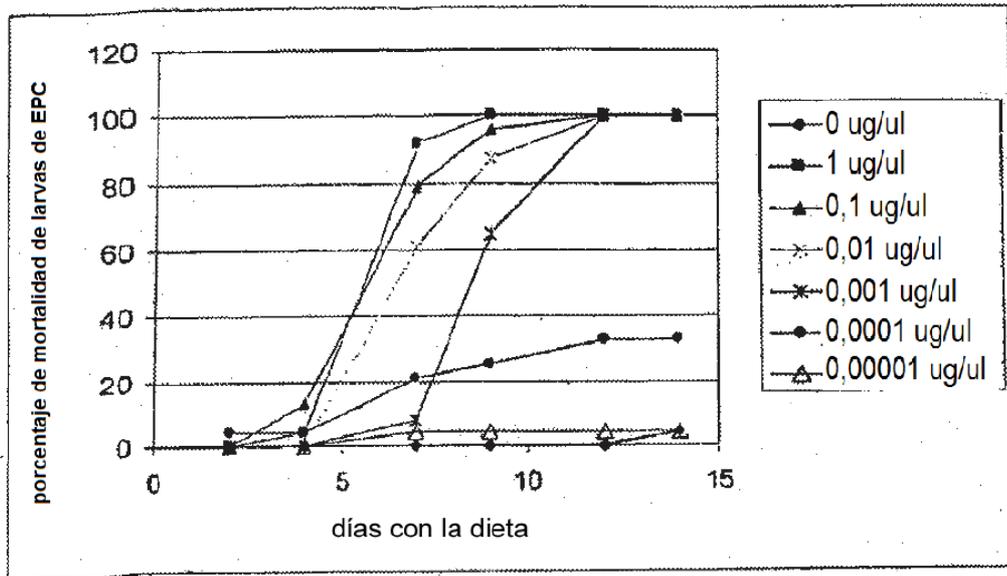


FIGURA 5(g)-LD

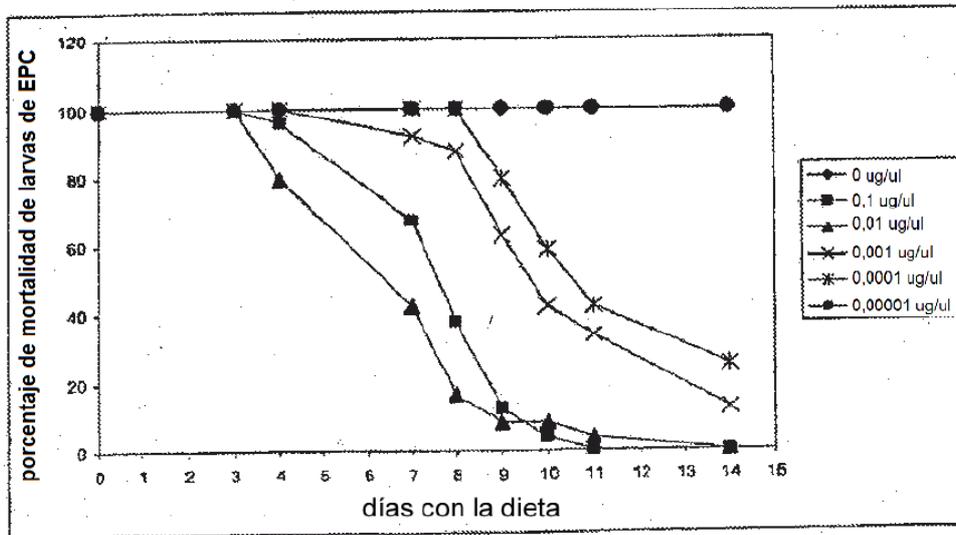


FIGURA 5(h)-LD

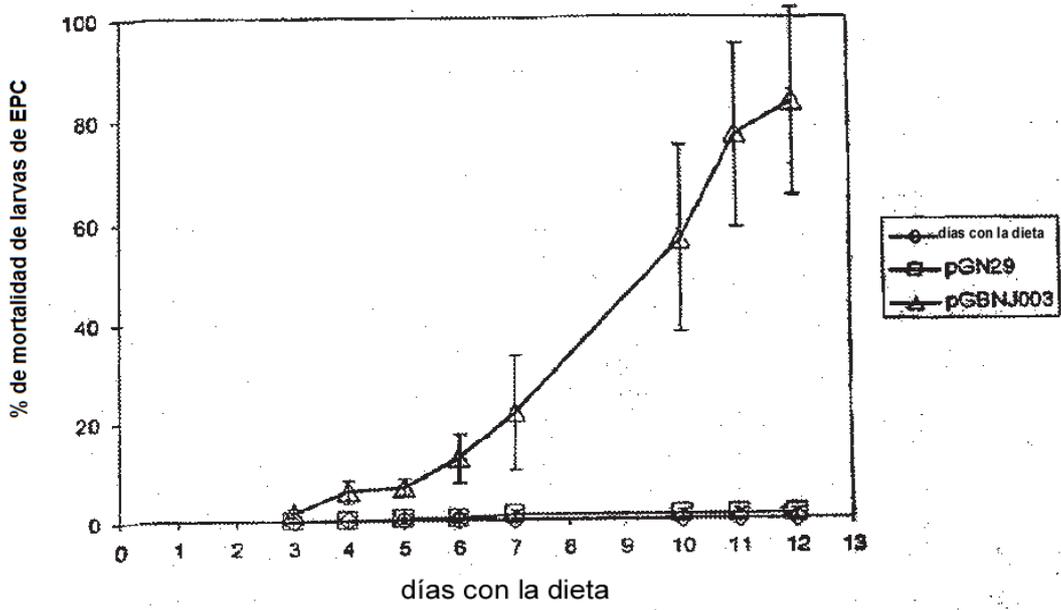


FIGURA 6(a)-LD

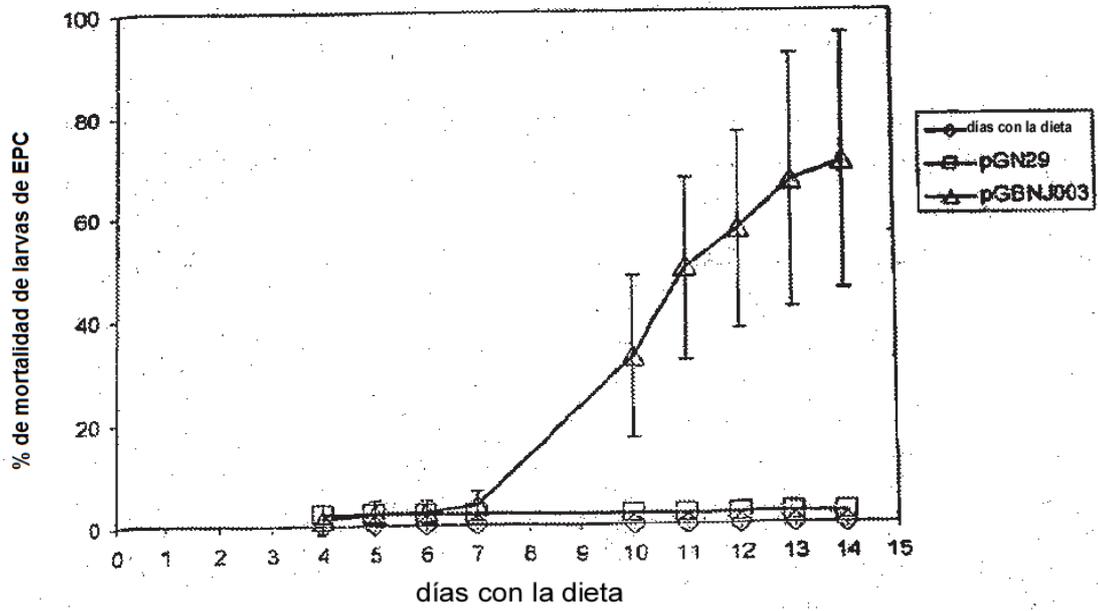


FIGURA 6(b)-LD

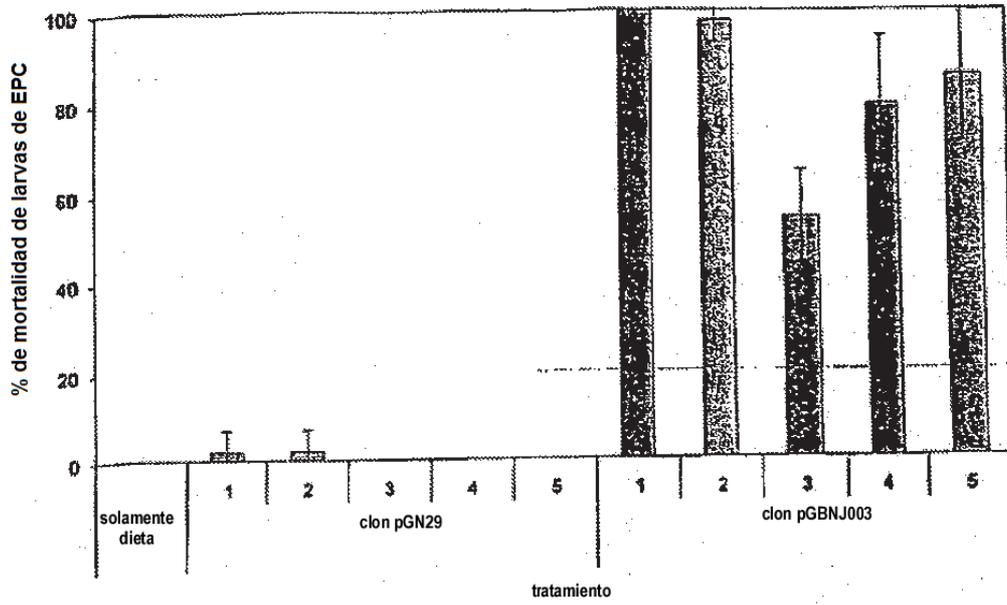


FIGURA 7(a)-LD

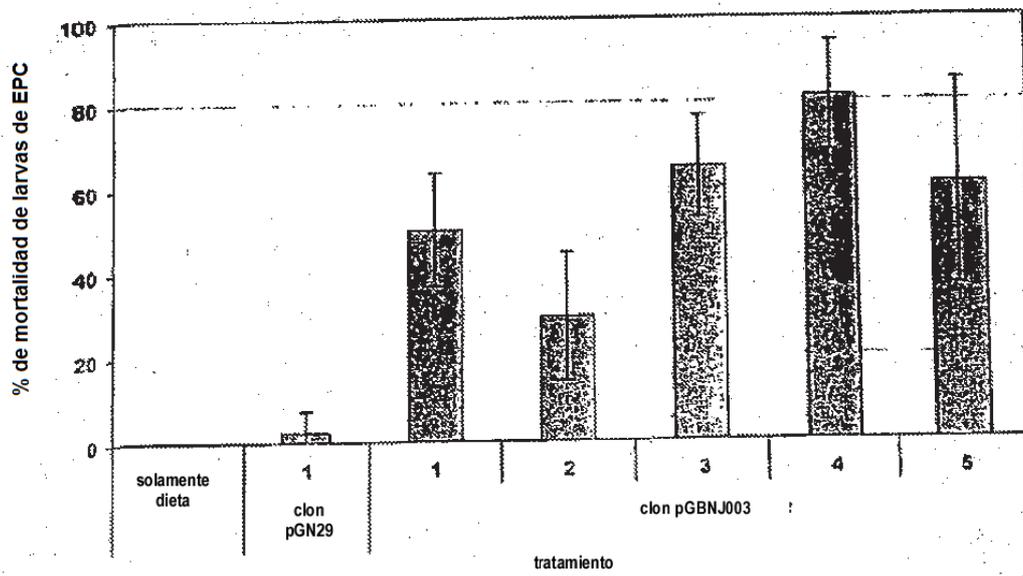


FIGURA 7(b)-LD

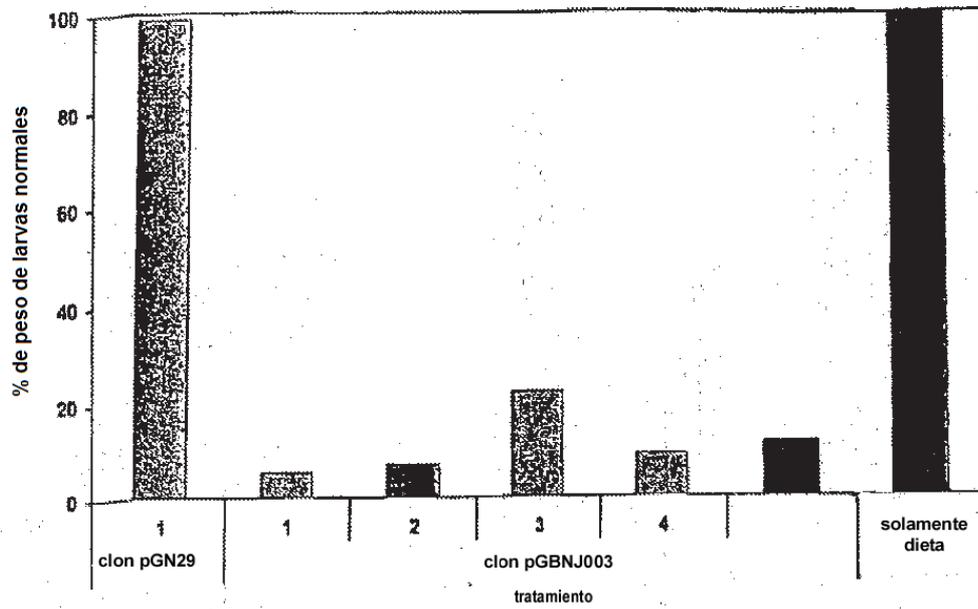


FIGURA 8(a)-LD

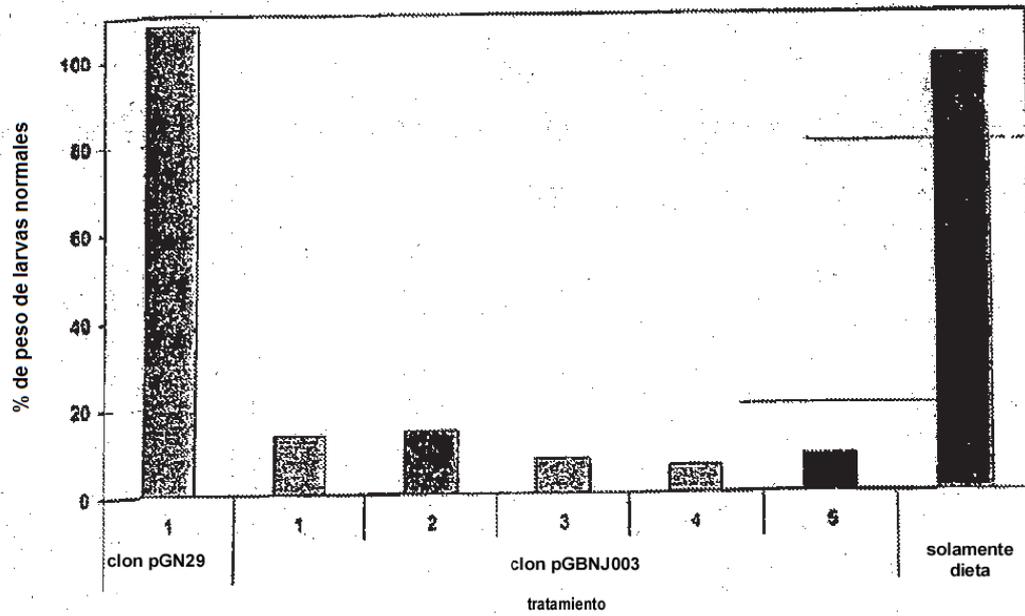


FIGURA 8(b)-LD

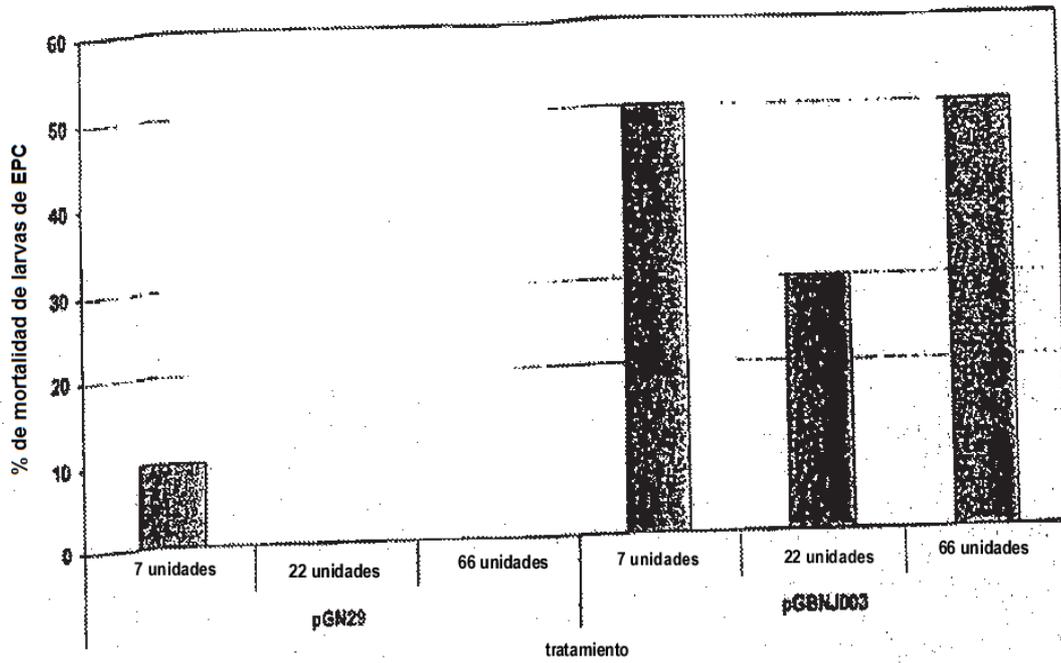


FIGURA 9-LD

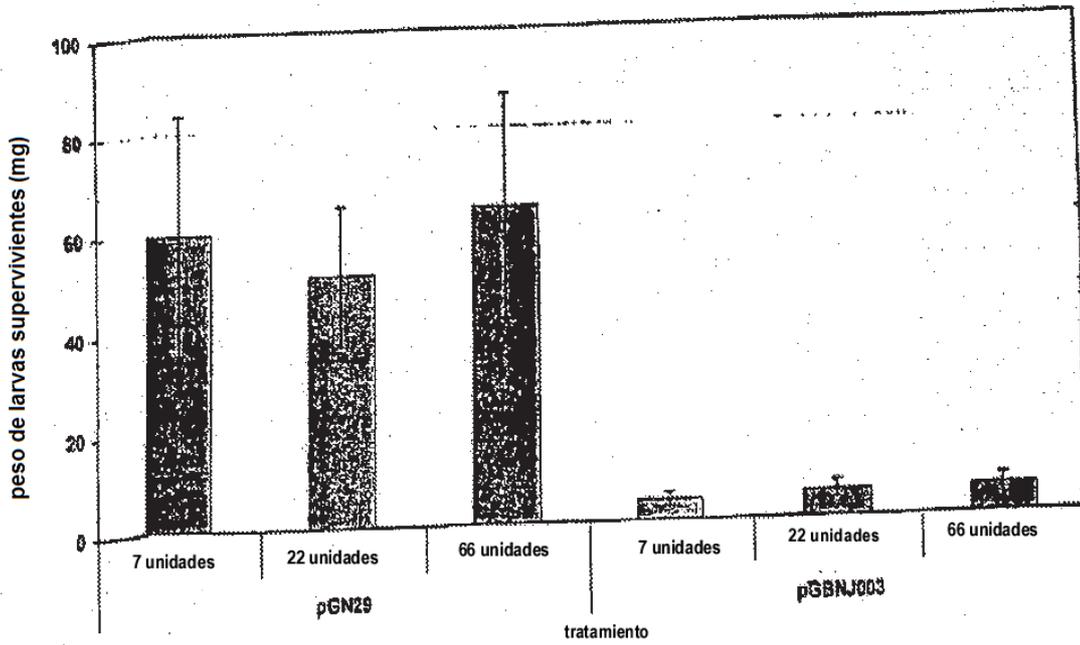


FIGURA 10-LD

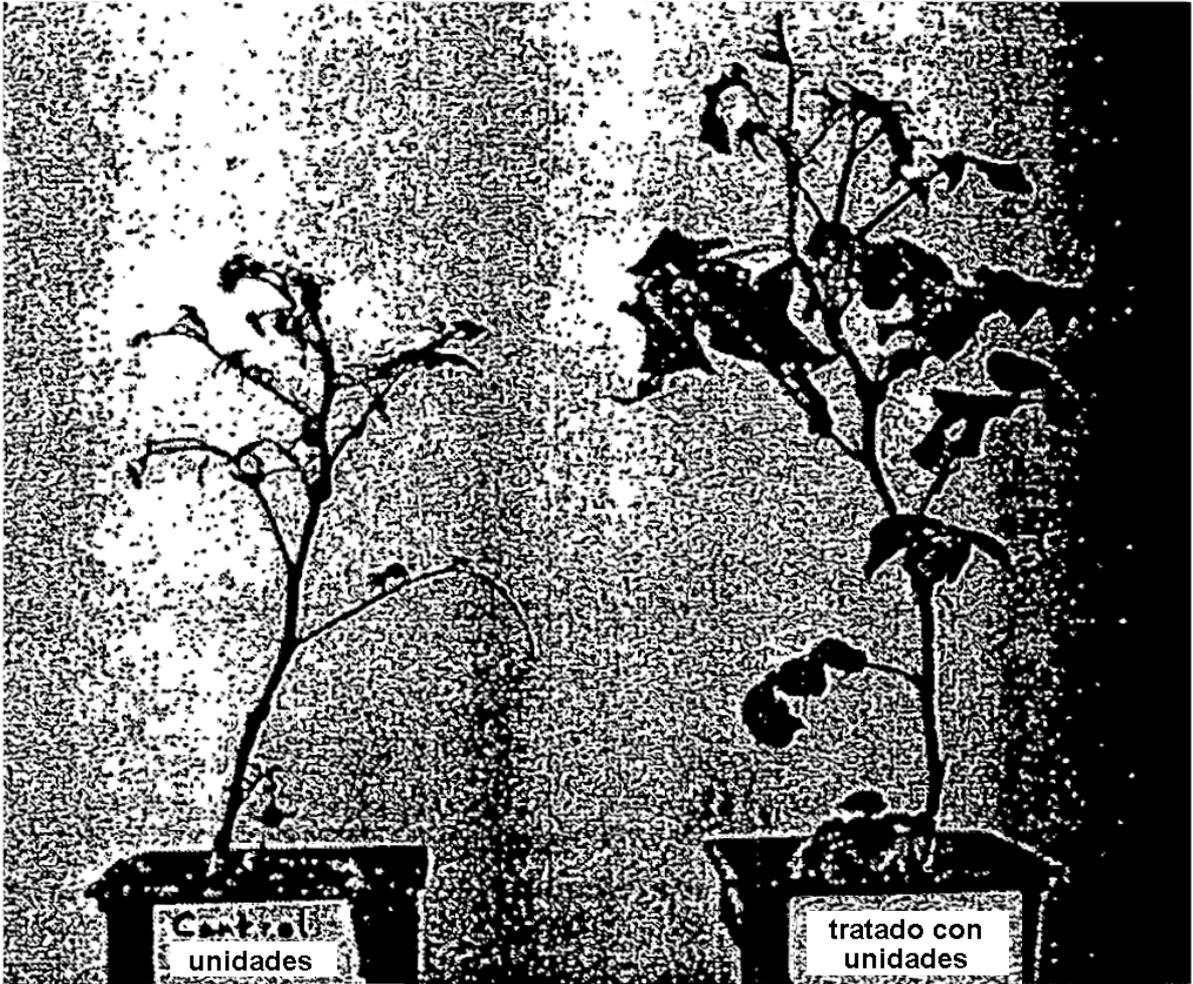
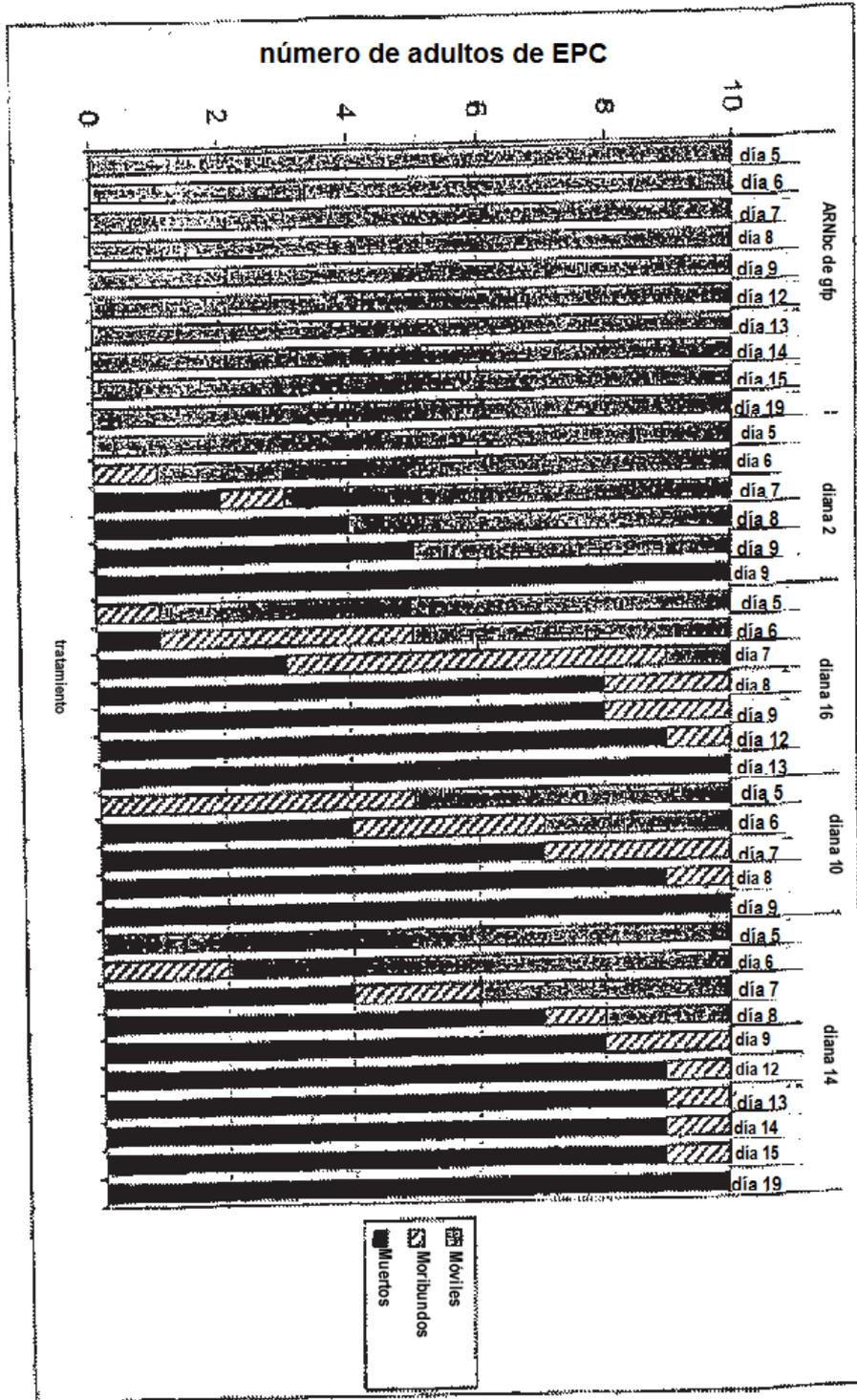


FIGURA 11-LD

FIGURA 12-LD



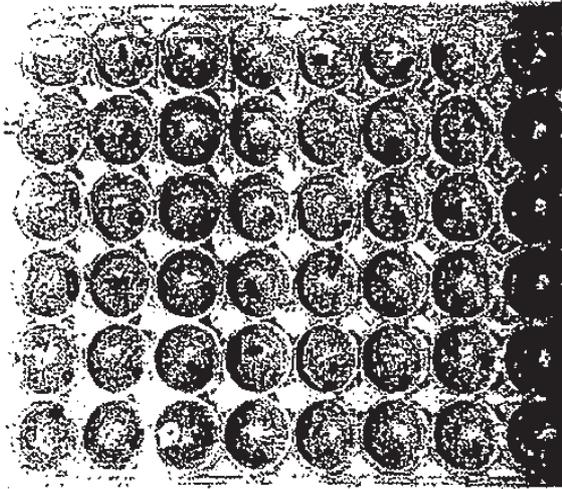


FIGURA 13(a)-LD

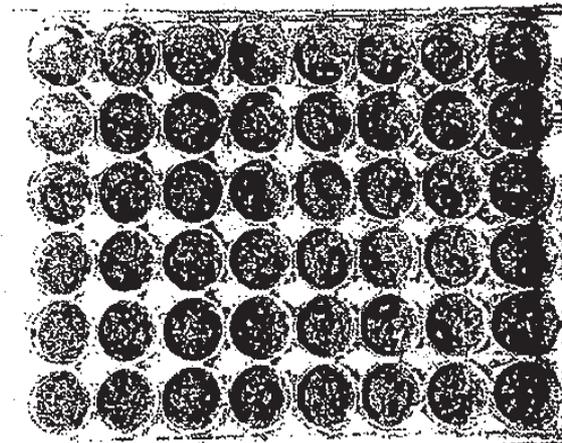


FIGURA 13(b)-LD

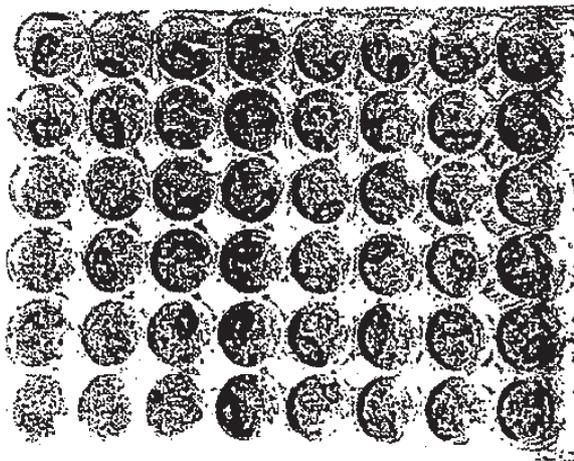


FIGURA 13(c)-LD

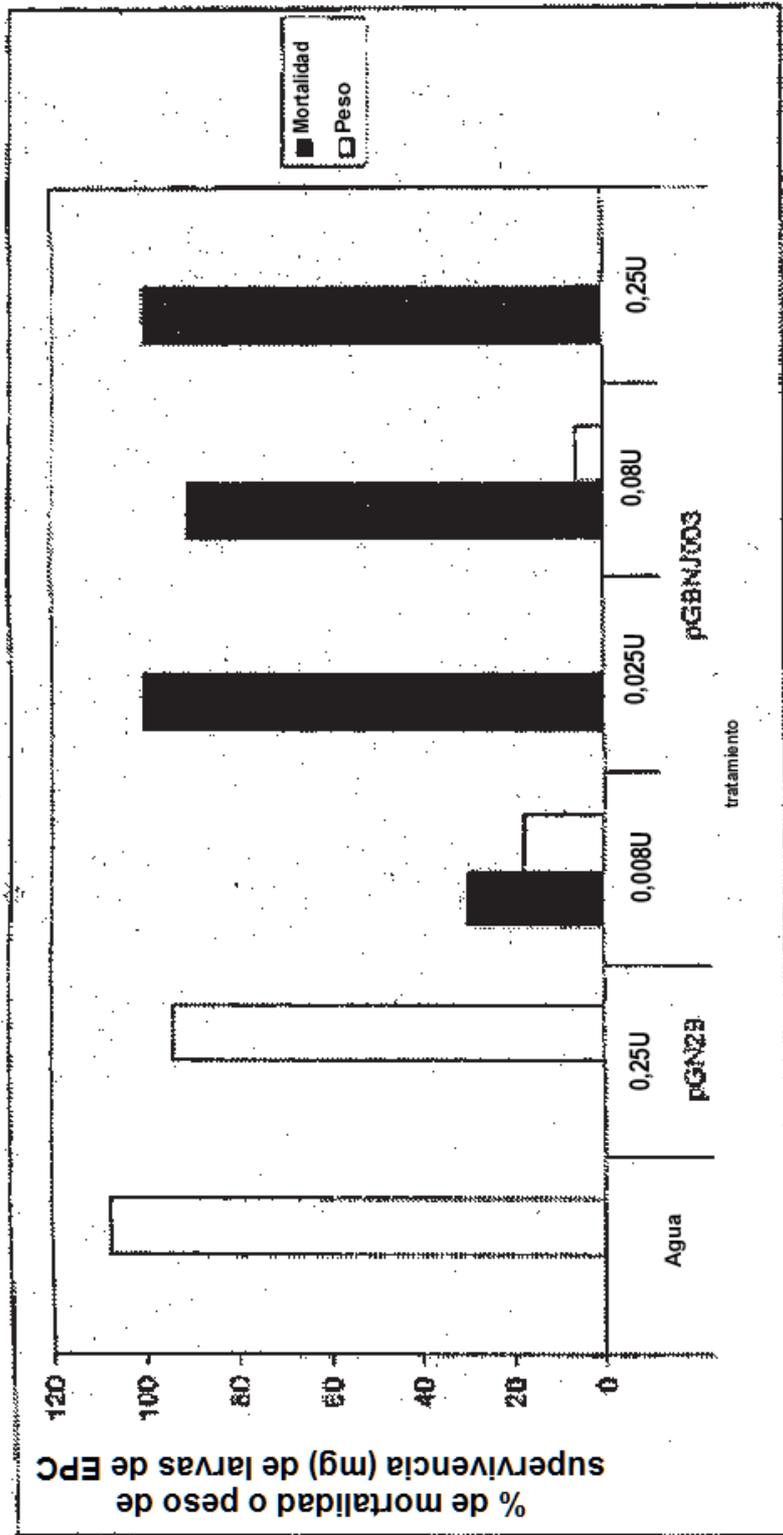


FIGURA 14-LD



FIGURA 15(a)-LD



FIGURA 15(b)-LD



FIGURA 15(c)-LD



FIGURA 15(d)-LD

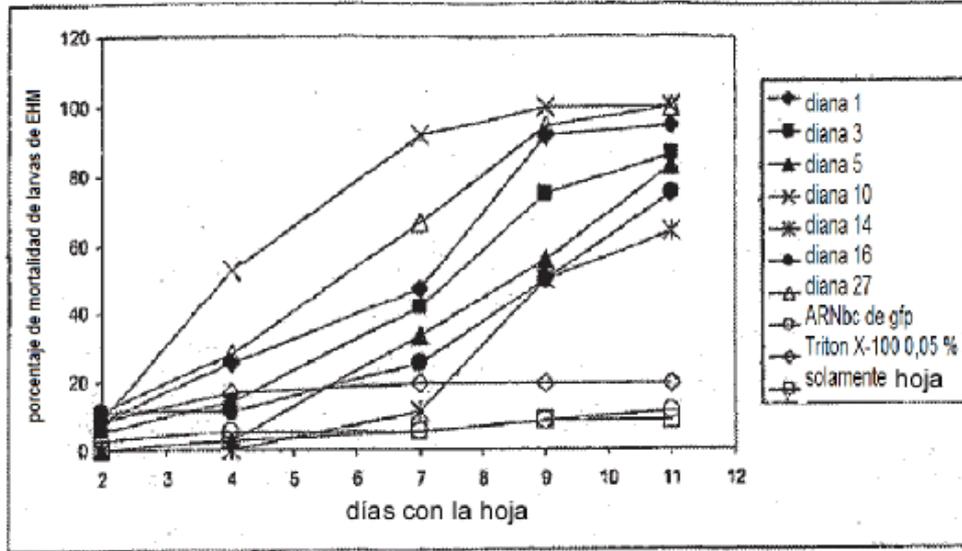


FIGURA 1(a)-PC

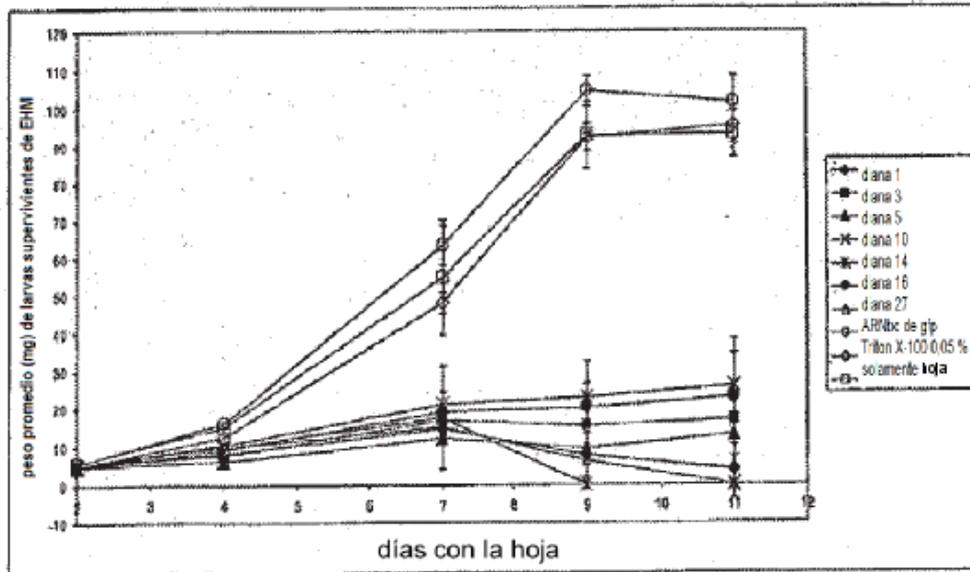


FIGURA 1(b)-PC

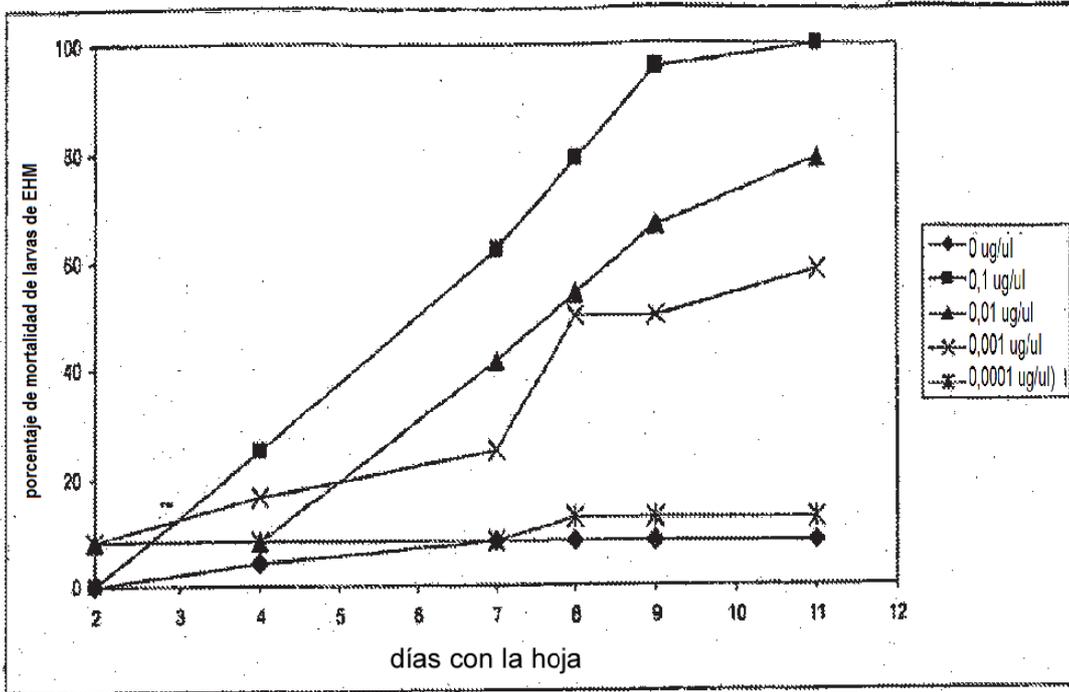


FIGURA 2(a)-PC

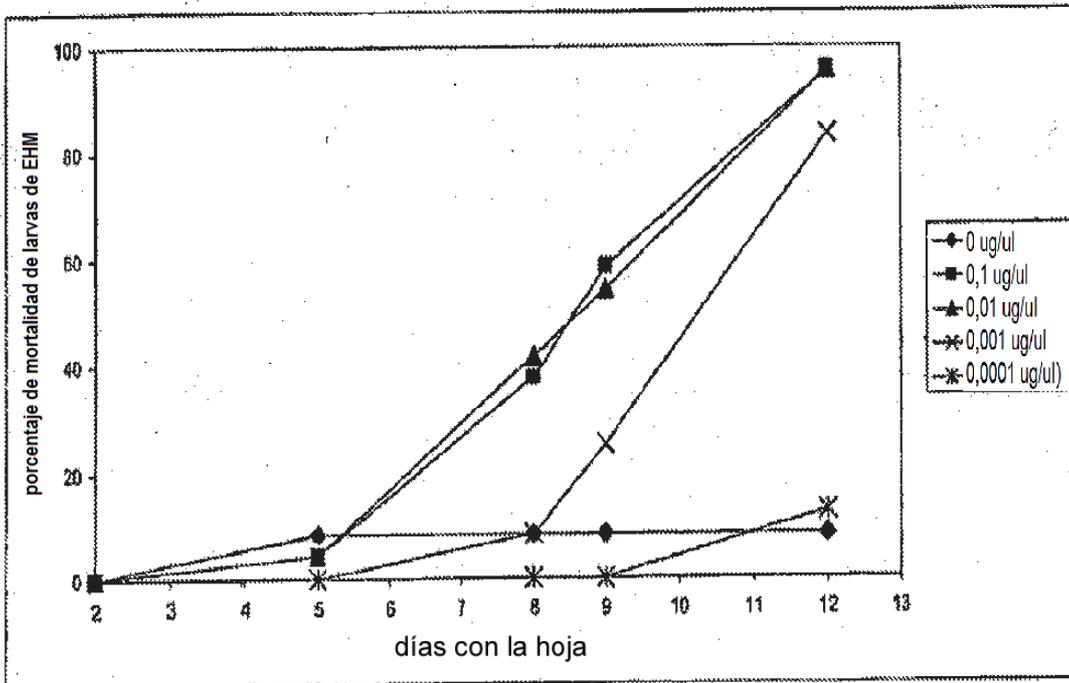


FIGURA 2(b)-PC

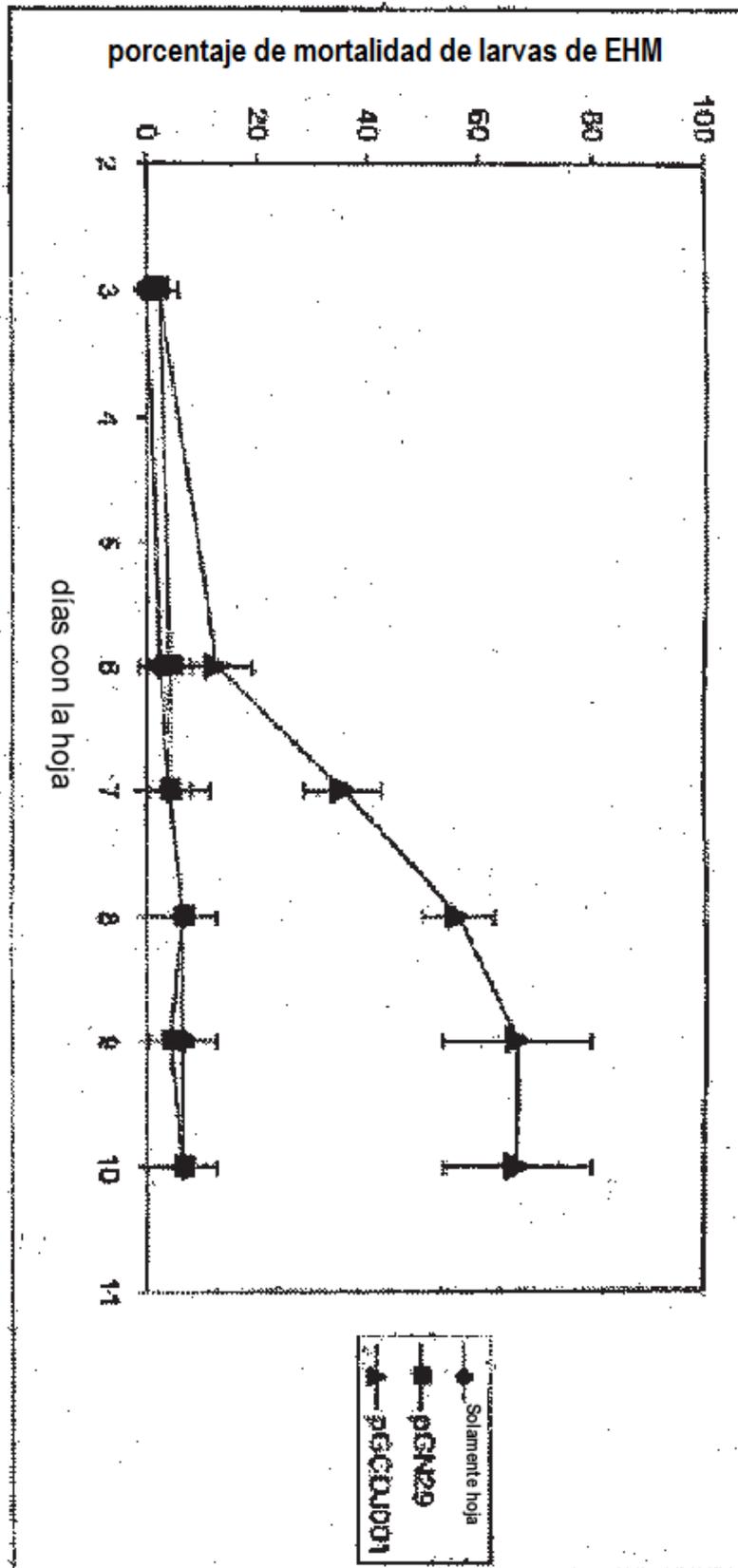


FIGURA 3-PC

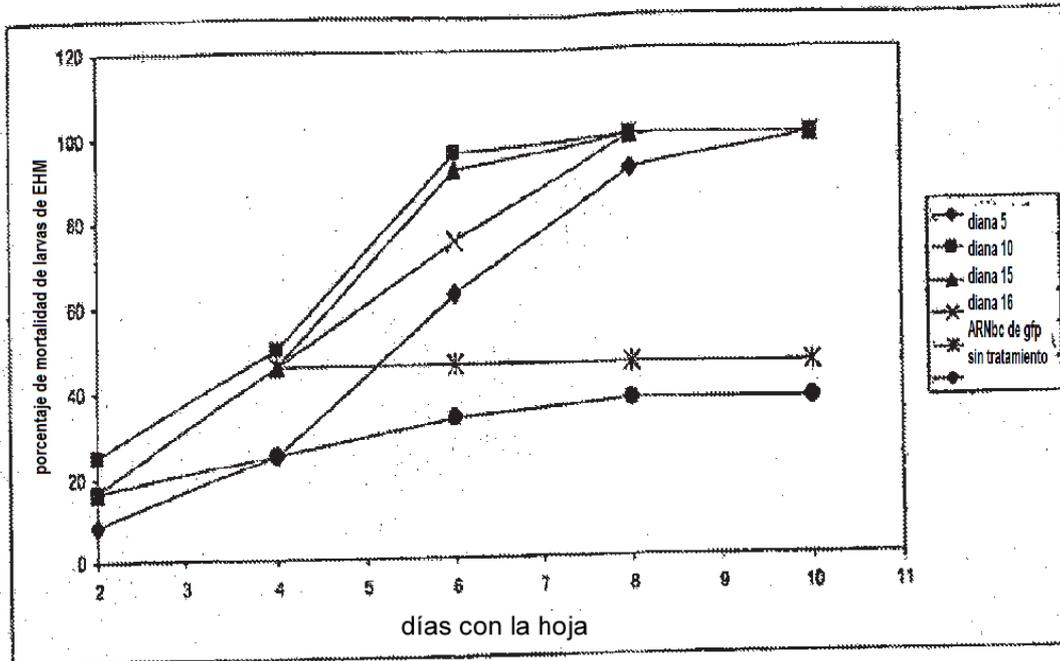


FIGURA 1-EV

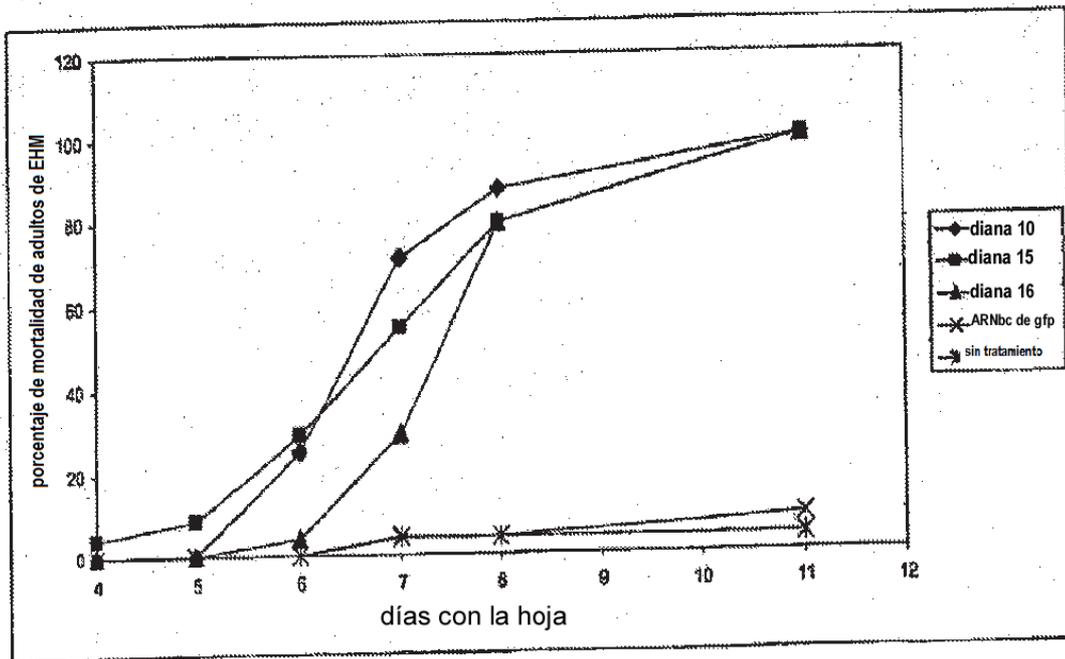


FIGURA 2(a)1-EV

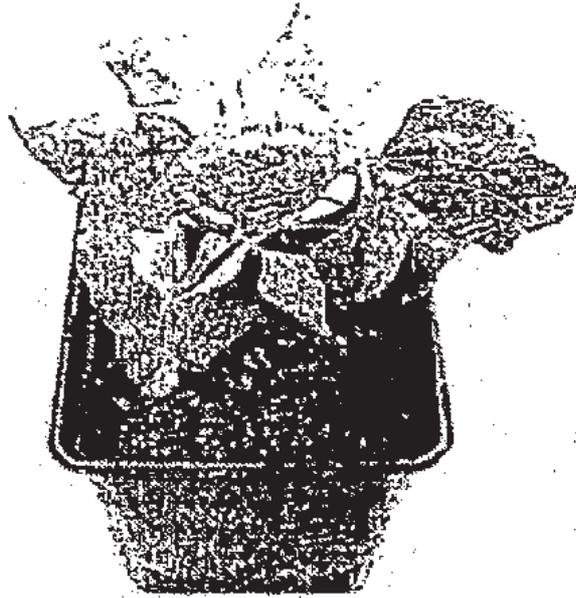


FIGURA 2(b)(i)-EV

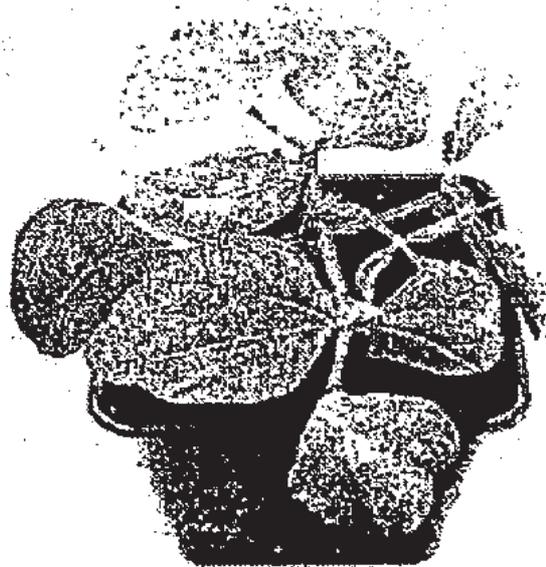


FIGURA 2(b)(ii)-EV



FIGURA 2(b)(iii)-EV

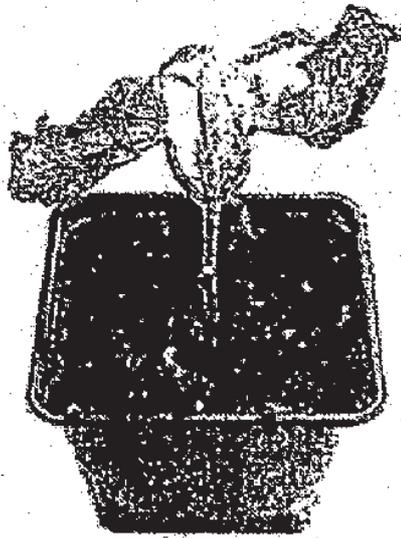


FIGURA 2(b)(iv)-EV



FIGURA 2(b)(v)-EV

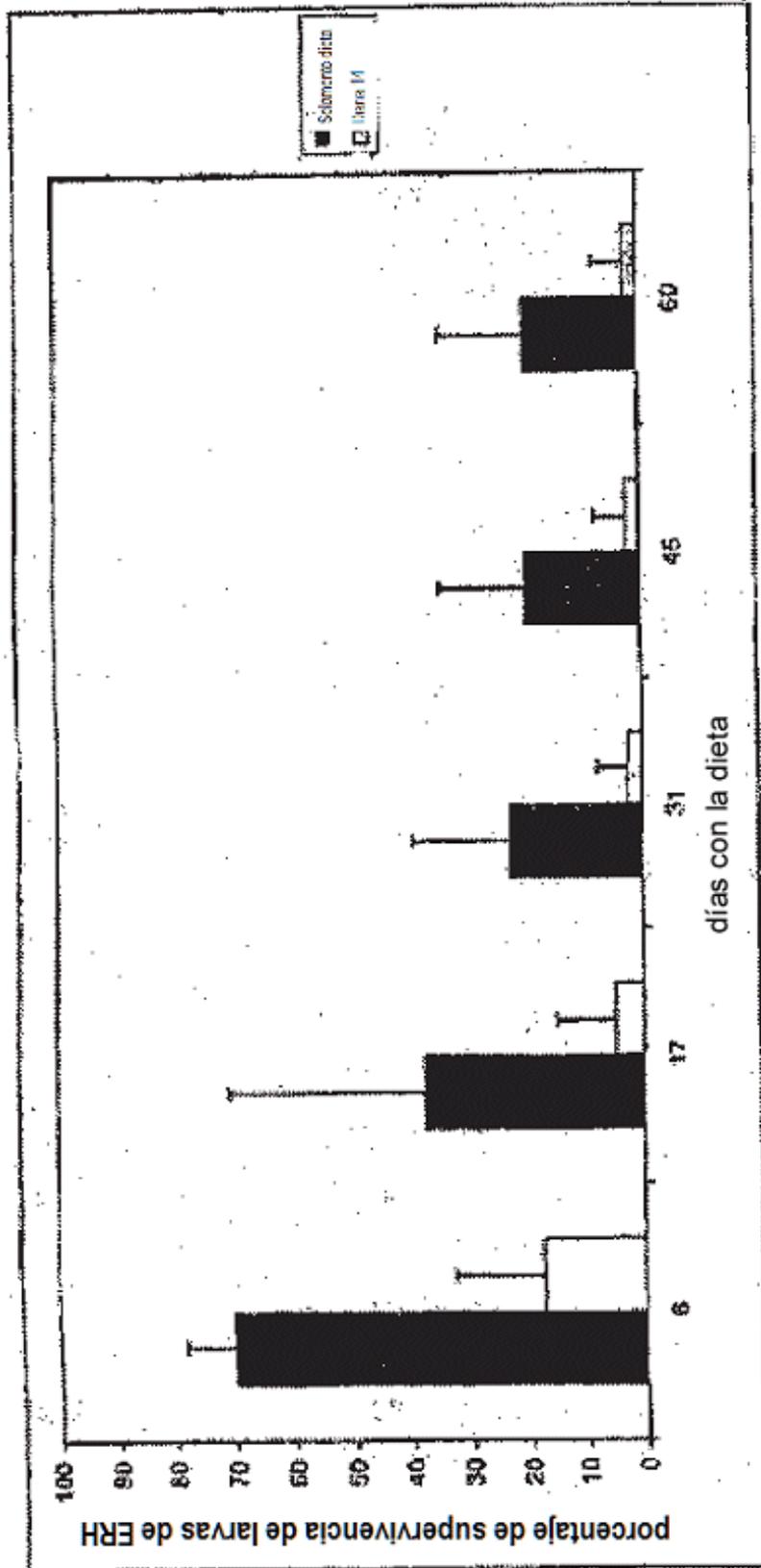


FIGURA 1-TC

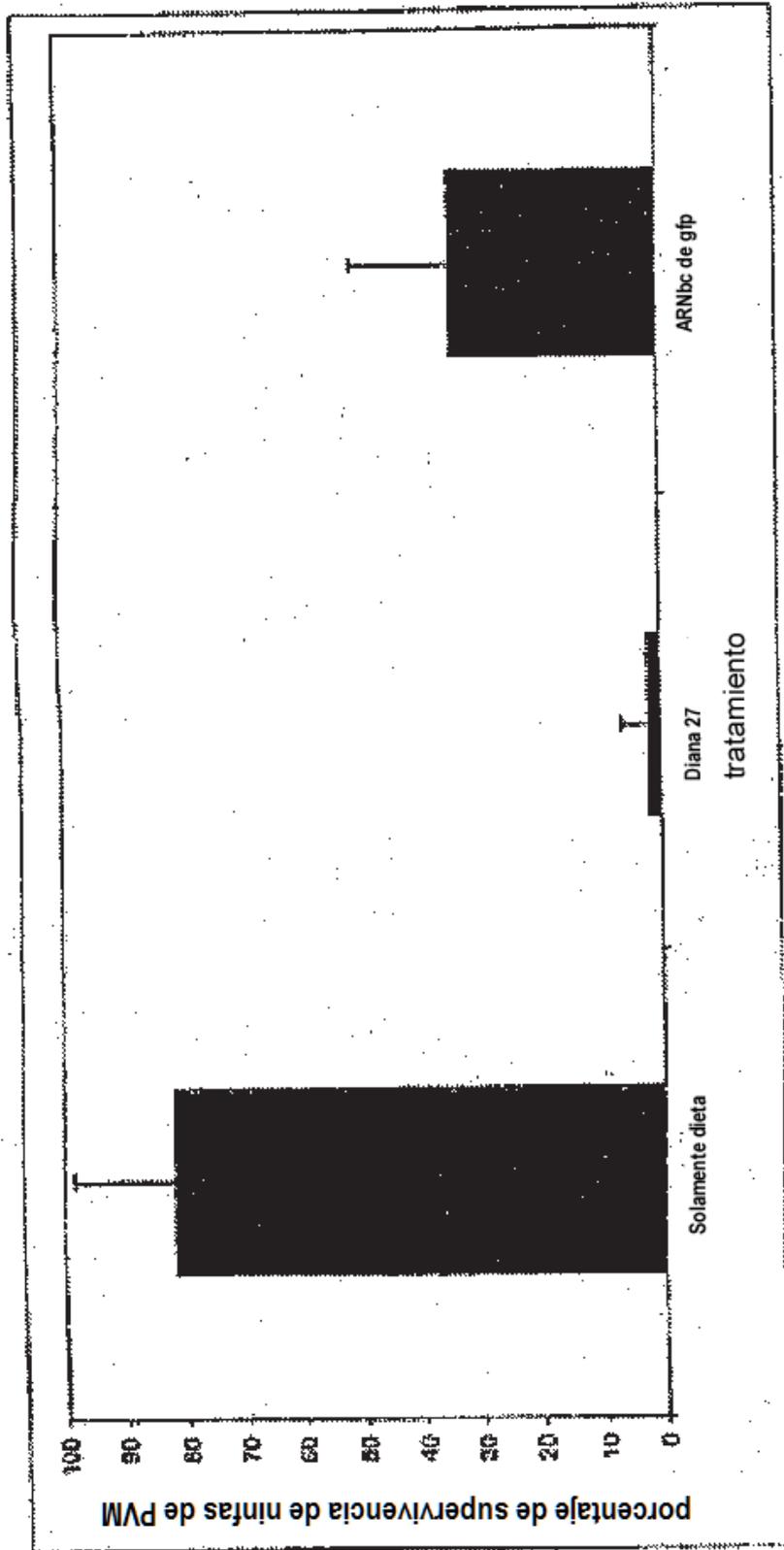


FIGURA 1-MP

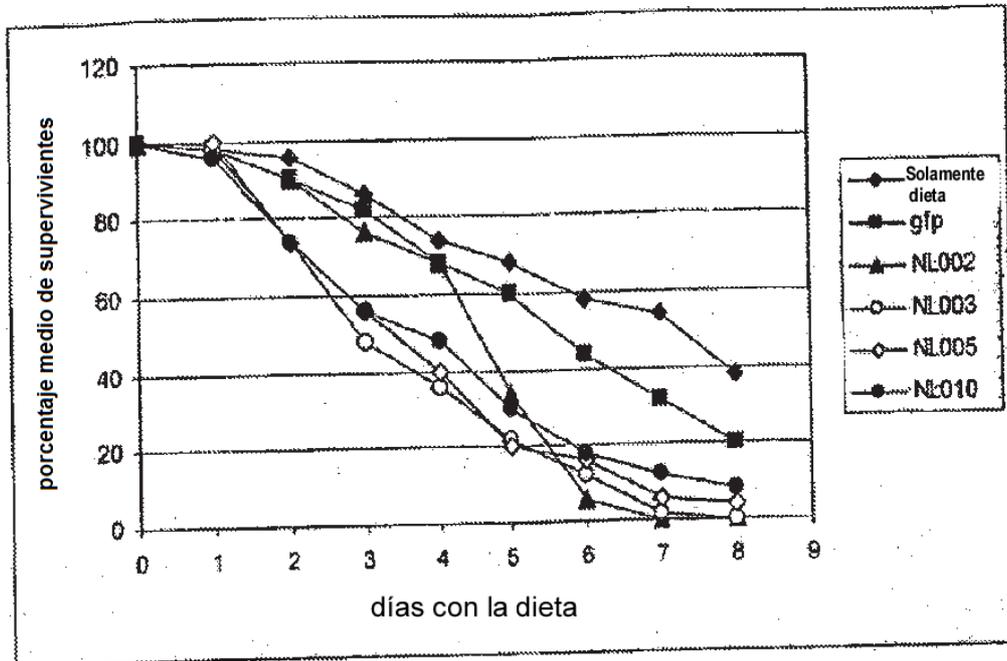


FIGURA 1 (a)-NL

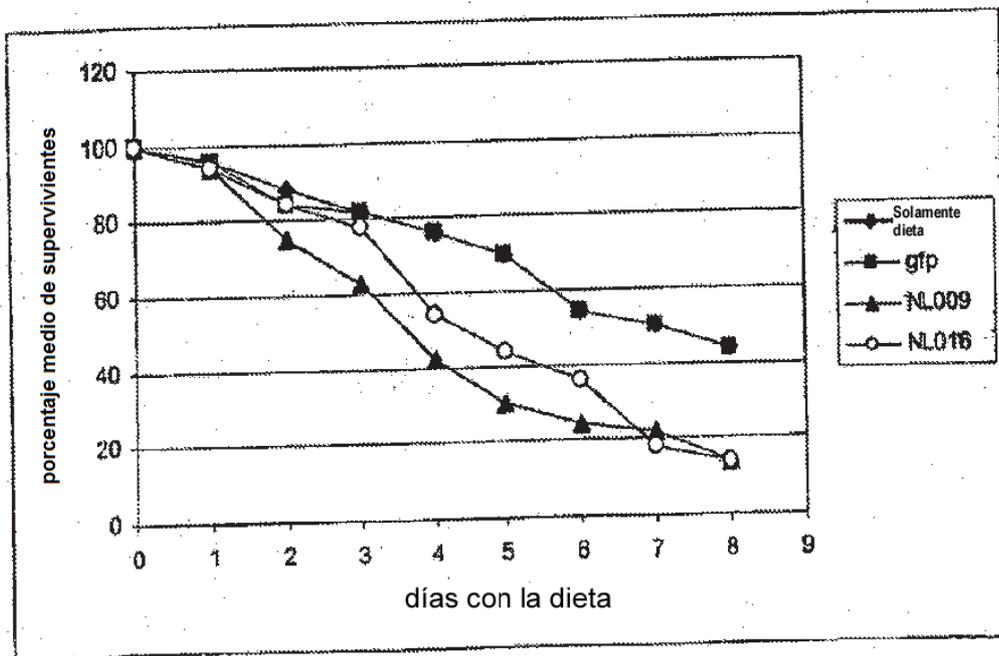


FIGURA 1 (b)-NL

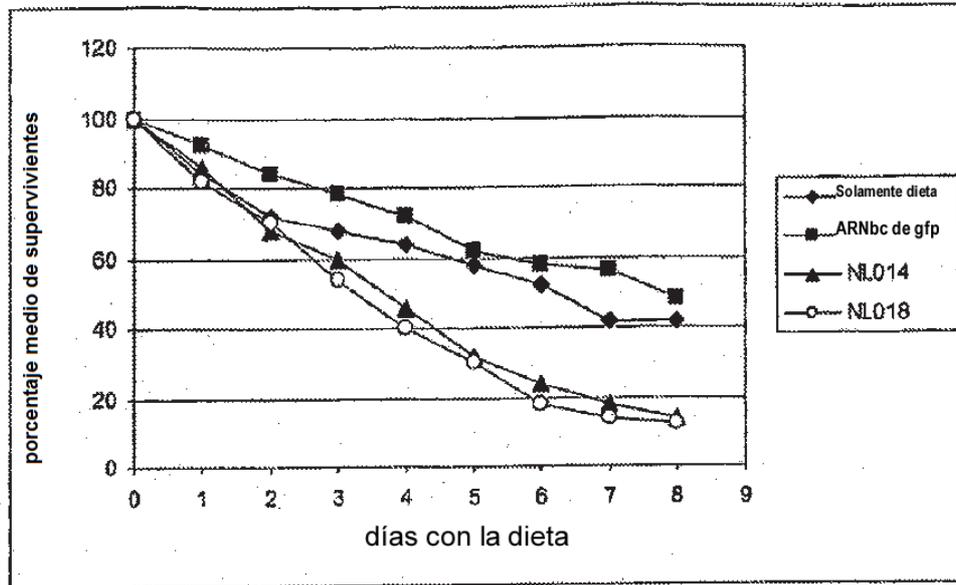


FIGURA 1 (c)-NL

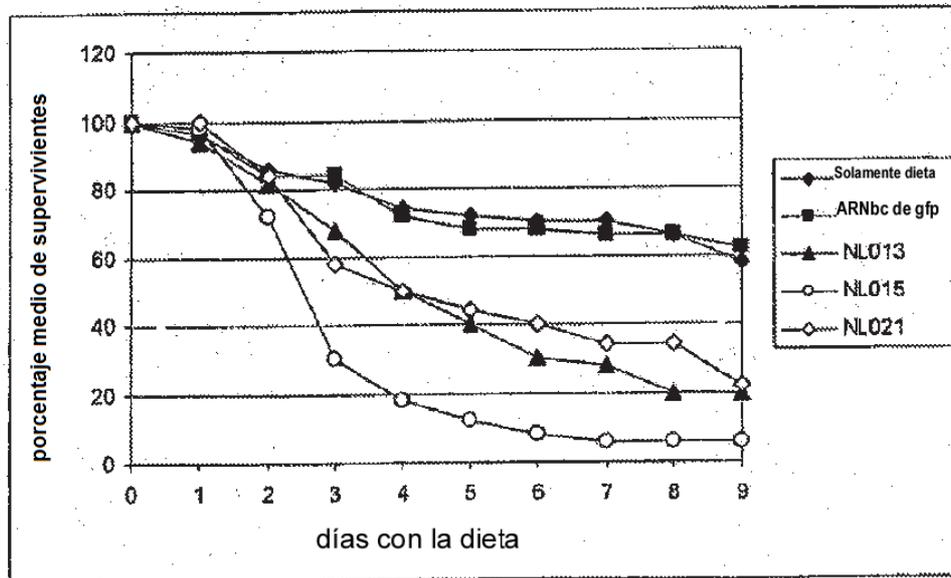


FIGURA 1 (d)-NL

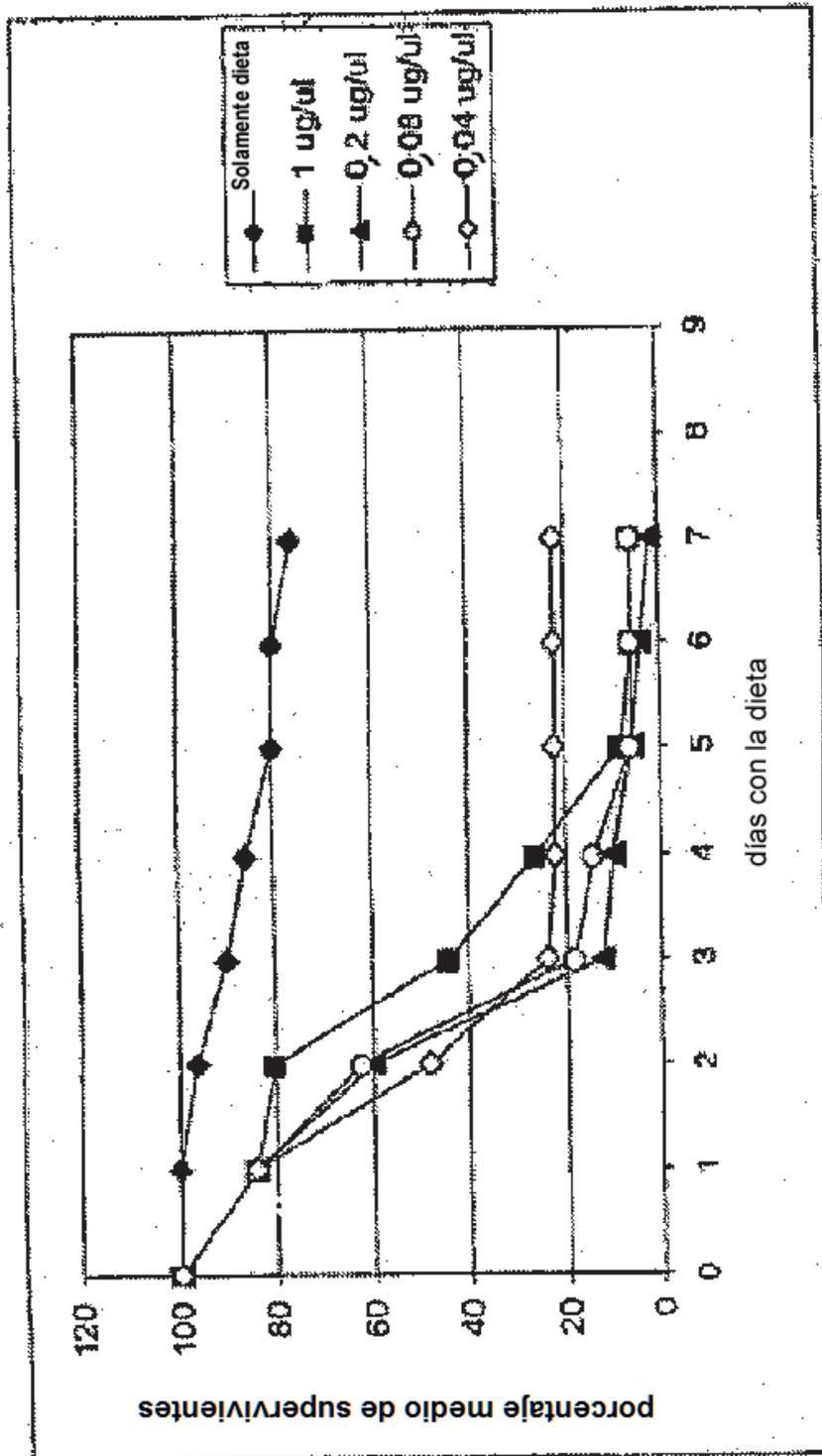


FIGURA 2-NL