06 101066

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

OP

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

- PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL -

21. **EXPEDIENTE No.** 06-101066

54. **TÍTULO** COMPOSICIONES Y METODOS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE INSECTOS EN PLANTAS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** MONSANTO TECHNOLOGY, LLC

DOMICILIO 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

22. **BOGOTÁ, D. C.,** 06 OCT. 2006

Cesión. Adjunta prioridad Anexo
Fw. 07-11-2006

(FORMA P-10)

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad. 06-101066- -00000-0000
Fec: 2006-10-06 14:39:51 Dep 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII
Eve: 379 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios 563

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[ ] Capítulo I [X] Capítulo II

② SOLICITANTE (71)	Nombre **MONSANTO TECHNOLOGY, LLC** Dirección **800 North Lindbergh Boulevard St. Louis, Missouri 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA** Nacionalidad o Domicilio **St Louis, MO, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA** Lugar de Constitucion **ESTADOS UNIDOS DE AMERICA** Telefono Fax E-mail	IDENTIFICACIÓN C C [ ] NIT [ ] C E [ ] Otro [ ] Cual Número
③ REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre **MARGARITA CASTELLANOS A** Direccion **CALLE 94A No. 7A-09** Telefono **610 7420** Fax **610 0706** E-mail info@castellanosyco com	IDENTIFICACIÓN C C [X] NIT [ ] C E [ ] Otro [ ] Cual Numero **39'779 654** TPA **70 819**
④ INVENTOR (ES) (72)	Nombre **VER ANEXO # 1** Direccion **VER ANEXO # 1** Nacionalidad o Domicilio **VER ANEXO # 1**	

⑤ **PCT (86)**

Solicitud Internacional No **PCT/US2005/011816** Fecha **08/04/2005**

Publicacion Internacional No **WO2005/110068 A2** Fecha **24/11/2005**

⑥ **Título (54)** **COMPOSICIONES Y METODOS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE INSECTOS EN PLANTAS**

⑦ **Clasificación Internacional (51)** **A01H 5/00**

⑧ **Prioridad** SI [X] NO [ ]

(33) Pais de Origen	(32) Fecha	(31) Numero de Solicitud
US	09/04/2004	60/560,842
US	27/04/2004	60/565,632
US	11/06/2004	60/579,062
US	20/08/2004	60/603,421
US	11/10/2004	60/617,261
US	07/04/2005	60/669,175

⑨ **Comprobante de pago No.** **06-76,699** **Fecha** **Octubre 4 de 2006**

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(10) Anexos

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [X] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [X] Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitucion del mismo a mi favor
- [ ] Documento de cesion del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [X] Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripcion, reivindicaciones, dibujos)
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- [ ] Traduccion del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biologico
- [ ] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso, informacion sobre otras solicitudes de patente o titulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invencion de esta solicitud
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- [X] Otros **Tarjeta de Propietario, Tarjeta Temática y Extracto para Publicación -**

(11) FIGURA CARACTERISTICA:

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

FIRMA

C C No **39.779 654 Usaquén** - TPA **70 819 C.S.J.**

06 OCT. 2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página. - MCA/gcb - 6081-FNPCT

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No 7 A-09
Bogotá, D C – COLOMBIA

ANEXO # 1

INVENTOR(ES) (72)

	NOMBRE	DIRECCION	NACIONALIDAD O DOMICILIO
1	**JAMES A. BAUM**	321 South Elm Avenue, Webster Groves, Missouri 63119, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	ESTADOUNIDENSE
2	**LARRY A. GILBERTSON**	131 Portico Drive, Chesterfield, Missouri 63017, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	ESTADOUNIDENSE
3	**DAVID K. KOVALIC**	7300 Cornell Avenue, University City, Missouri 63130, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	ESTADOUNIDENSE
4	**THOMAS J. LAROSA**	651 Green Forest Drive, Fenton, Missouri 63026, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	ESTADOUNIDENSE
5	**MAOLONG LU**	4204 Calle Isabelino, San Diego, California 92130, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	CANADIENSE
6	**TICHAFA R.I. MUNYIKWA**	406 Palermo Drive, Ballwin, Missouri 63021, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	ZIMBABWE
7	**JAMES K. ROBERTS**	15422 Clover Ridge Drive, Chesterfield, Missouri 63017, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	ESTADOUNIDENSE
8	**WEI WU**	2277 Bennington Place, St Louis, Missouri 63043, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	ESTADOUNIDENSE
9	**BEI ZHANG**	1056 Oakwood Farms Lane, Ballwin, Missouri 63021, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	CHINA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-101066- -00000-0000
Fec: 2006-10-06 14:38:51 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII
Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 503

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 76,699
FECHA : OCTUBRE 4 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	53373597	04/10/2006	2,499,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL : $	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

5

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No 7 A-09
Bogota, D C – COLOMBIA

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo, Industria y Turismo

E S D

Ref **PODER** conferido por **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Yo, **XIMENA CASTELLANOS ABONDANO,** mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pié de mi firma, atentamente manifiesto a Uds que sustituyo en la Dra **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO,** el poder que me confirió **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**, con domicilio en **800 North Lindberg Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**, debidamente legalizado por Apostilla bajo el No **142500**, el día **21 de Diciembre de 2005**, con las mismas facultades que me fueron conferidas, para tramitar la solicitud de patente PCT Entrada en Fase Nacional, para **"COMPOSICION Y METODOS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE INSECTOS EN PLANTAS".-**

Del Señor Jefe,

Acepto

Ximena Castellanos Abondano
C C No **39.773.330** de Usaquén
T P A No **58.236** del C S J
Calle 94 A No 7 A-09 – Bogotá
PBX 610 74 20

Margarita Castellanos Abondano
C C No **39.779.654** de Usaquén
T P A No **70.819** del C S J
Calle 94 A No 7 A-09 – Bogotá
PBX 610 74 20

Bogota, D C
XCA/MCA/gcb/ 6081-FNPCT

G/USER/DEPTO PAT/PATENTES/60/6081-FNPCT/MEMORIAL DE SUSTITUCION PODER

AUTENTICACION DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL
(Art. 84 C.P.C. mod. Decr. 2282 de 1989, art. 1 mod. 36)
Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo
de esta ciudad compareció personalmente:
Almena Castellanos Abondano
identificado con C.C. 39773330
expedida en: Usaquen y tarjeta profesio-
nal de abogado(a) No. 58236 del Consejo
Superior de la Judicatura, con documento di-
rigido a Superindustria y Comercio
y declaró que la firma puesta en este escrito es
suya.

Firma del declarante

En Bogotá D.C. a 03 OCT. 2006

AUTORIZO ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO

REPUBLICA DE COLOMBIA
Círculo de Santafé
de Bogotá, D.C.
NOTARIA 41
Carrera 12 Nº 93-26
AGUSTIN MORALES RIVEIRA
ORIGINAL

AUTENTICACION DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL
(Art. 84 C.P.C. mod. Decr. 2282 de 1989, art. 1 mod. 36)
Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo
de esta ciudad compareció personalmente:
Margarita Castellanos Abondano
identificado con C.C. 39779651
expedida en: Usaquen y tarjeta profesio-
nal de abogado(a) No. del Consejo
Superior de la Judicatura, con documento di-
rigido a Superintendencia Industria y Comercio
y declaró que la firma puesta en este escrito es
suya.

Firma del declarante

En Bogotá D.C. a 03 OCT. 2006

AUTORIZO ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO

REPUBLICA DE COLOMBIA
Círculo de Santafé
de Bogotá, D.C.
NOTARIA 41
Carrera 12 Nº 93-26
AGUSTIN MORALES RIVEIRA
ORIGINAL

COLOMBIA

PODER

El (los) **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Domiciliados en **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94 A No 7 A-09, Bogotá-Colombia para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
b) Para la obtención de registros sanitarios;
c) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy **19 de Diciembre de 2005**

en **St. Louis, Missouri, USA**

por **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Of **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS** a. attorneys residing at Calle 94 A No 7 A-09, Bogotá-Colombia, to obtain the protection of my (our Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following

a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks service, collective and defensive marks, and of designations of origin, the deposit of trade names and ensigns, its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights,
b) For the obtainment of Sanitary registrations,
c) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights, actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this 19th December, 2005

in St. Louis, Missouri

by Dennis R. Hoerner

Dennis R. Hoerner

(Notary shall execute on the next page)

(Consular legalization or apostille is required)

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista.
Bogotá, D.C.
05 OCT 2006
AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)

NOTARIAL CERTIFICATION (Corporation)

COLOMBIA

Hoy 19de Dic. del año 2005
compareció (eron) personalmente
DENNIS R. HOERNER

a quienes conozco como la(s) personas que firma(n) en representación de la Sociedad (Compañía) denominada
MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Certifico .
a) Que MONSANTO TECHNOLOGY LLC

es una sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de
b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
St. Louis, Missouri

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad /Compañía.
d) Que el Sr. DENNIS R. HOERNER
esta autorizado para otorgar el presente poder Lo anterior esta probado por medio de los siguientes documentos, que certifico he visto*

(Ciudad) St. Louis

(Estado) Missouri

Hoy 19 del Diciembre de 2005

(Notario Público)

*Los documentos debe identificarse con fecha y origen.

On this 19 day of Dec. of 2005
personally appeared

Dennis R. Hoerner

whom I know to be the person(s) who signed this document as representative(s) of the Corporation /Company named
Monsanto Technology LLC
I certify:
a) That
Monsanto Technology LLC

is a corporation (Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of
b) That the domicile of said Corporation/Company is
St. Louis, Missouri

c) That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the object set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company
d) That Mr. Dennis R. Hoerner
is (are) authorized to grant the present Power of Attorney. The aforementioned was duly proven through the following documents and I duly certify having seen them*.

(City) St. Louis

(State) Missouri

this 19 day of Dec of the year 2005

(Notary Public) Michelle Ludwig

*Documents must be identified with date and origin

NOTARY PUBLIC NOTARY SEAL STATE OF MISSOURI

MICHELLE LUDWIG
My Commission Expires
July 13, 2009
St Louis County
Commission #05550747

Esta copia coincide con el original que tuvo a la vista.
Bogotá, D.C.
03 OCT 2006
AGUSTIN MORALES RIVEIRA

8

6027-1 MHPC

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

2. This public document has been signed by MICHELLE LUDWIG
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp of MICHELLE LUDWIG-NOTARY PUBLIC-STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 21ST day of DECEMBER, 2005.
7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 142500
9. Seal/Stamp
10. Signature:

Robin Carnahan

Comm 48 (01-2005)

Esta copia concuerda con el original que tuve a la vista.
Bogotá, D.C.
03 OCT 2006
ACUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

----------TRADUCCION OFICIAL No. 06-02-04----------

de un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia, al igual que la presente.----------

(Adjunto a un documento de Poder otorgado por MONSANTO TECHNOLOGY LLC)

Sello Notarial:

MICHELLE LUDWIG

Mi comisión vence Julio 13, 2009

Condado de St. Louis – Comisión #05550747

APOSTILLA

(Convención de La Haya de octubre 5, 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por Michelle Ludwig
3. actuando en su carácter de Notario Púbilco
4. Lleva el sello de Michelle Ludwig – Notario Público – Estado de Missouri

CERTIFICADO

5. En Jefferson City, Missouri
6. El día 21 de Diciembre de 2005



7. por Robin Carnahan, Secretario de Estado, Estado d Missouri

8. No. 142500

9. Sello (en dorado) 10. Firma:

(fdo) Robin Carnahan

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Febrero 9, 2006. .

DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02759/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 FEB 13 A 11: 5[illegible]

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

613662

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESENFRENA LAS FUNCIONES INDICADAS

Esta copia coincide con el original que tuvo a la vista.

Bogotá D.C.

03 OCT 2006

AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

6051
11

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
24 November 2005 (24.11.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/110068 A2

(51) International Patent Classification[7]: A01H 5/00

(21) International Application Number: PCT/US2005/011816

(22) International Filing Date: 8 April 2005 (08 04 2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/560,842	9 April 2004 (09 04 2004)	US
60/565,632	27 April 2004 (27 04 2004)	US
60/579,062	11 June 2004 (11 06 2004)	US
60/603,421	20 August 2004 (20 08 2004)	US
60/617,261	11 October 2004 (11 10 2004)	US
60/	7 April 2005 (07.04 2005)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: MONSANTO TECHNOLOGY LLC [—/US], 800 North Lindbergh Boulevard, Mail Zone E2NA, St Louis, MO 63167 (US)

(72) Inventors, and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)* BAUM, James, A. [US/US], 321 S. Elm Avenue, Webster Groves, MO 63119 (US). GILBERTSON, Larry, A. [US/US], 131 Portico Drive, Chesterfield, MO 63017 (US) KOVALIC, David, K. [US/US], 7300 Cornell Avenue, University City, MO 63130 (US) LAROSA, Thomas, J. [US/US], 651 Green Forest Drive, Fenton, MO 63026 (US) LU, Maolong [CA/US], 1204 Calle Isabelino, San Diego, CA 92130 (US) MUNYIKWA, Tichafa, R., I. [ZW/US], 406 Palermo Drive, Ballwin, MO 63021 (US) ROBERTS, James, K. [US/US], 15422 Clover Ridge Drive, Chesterfield, MO 63017 (US) WU, Wei [US/US], 2277 Bennington Place, St Louis, MO 63043 (US) ZHANG, Bei [CN/US], 1056 Oakwood Farms Lane, Ballwin, MO 63021 (US)

(74) Agent: BALL, Timothy, K., Monsanto Technology LLC, 800 North Lindbergh Boulevard, Attention Gail P Wuellner, Mail Zone E2NA, St Louis MO 63167 (US)

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN YU, ZA, ZM, ZW

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG KZ, MD, RU, TJ TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR CONTROL OF INSECT INFESTATIONS IN PLANTS

(57) Abstract: The present invention is directed to controlling pest infestation by inhibiting one or more biological functions in an invertebrate pest The invention discloses methods and compositions for use in controlling pest infestation by feeding one or more different recombinant double stranded RNA molecules to the pest in order to achieve a reduction in pest infestation through suppression of gene expression The invention is also directed to methods for making transgenic plants that express the double stranded RNA molecules, and to particular combinations of transgenic pesticidal agents for use in protecting plants from pest infestation

WO 2005/110068 A2

Application for Patent for

COMPOSITIONS AND METHODS FOR CONTROL OF INSECT INFESTATIONS IN PLANTS

by

James A. Baum

Larry A. Gilbertson

David K. Kovalic

Thomas J. LaRosa

Maolong Lu

Tichifa R. I. Munyikwa

James K. Roberts

Wei Wu

and

Bei Zhang

Cross Reference to Related Applications

This application claims priority to US Provisional Applications 60/560,842, filed April 9, 2004, 60/565,632, filed April 27, 2004, 60/579,062, filed June11, 2004, 60/603,421, filed Aug.20, 2004, 60/617,261, filed Oct. 11, 2004, and 60/_____, filed April 7, 2005, each incorporated herein by reference in its entirety.

Field of the Invention

The present invention relates generally to genetic control of pest infestations in plants and in and on animals. More specifically, the present invention relates to the methods for modifying endogenous expression of coding sequences in the cell or tissue of a particular pest. More specifically, the present invention utilizes recombinant DNA technologies to post-transcriptionally repress or inhibit expression of a target coding sequence in the cell of a pest, by feeding to the pest one or more double stranded or small interfering ribonucleic acid (RNA) molecules transcribed from all or a portion of a target coding sequence, thereby controlling the infestation. Therefore, the present invention relates to sequence-specific inhibition of expression of coding sequences using double-stranded RNA (dsRNA) or small interfering RNA (siRNA) to achieve the intended levels of pest control.

Novel isolated and substantially purified nucleic acid molecules including but not limited to non-naturally occurring nucleotide sequences and recombinant DNA constructs for transcribing the dsRNA or siRNA molecules of the present invention are also provided that suppress or inhibit the expression of an endogenous coding sequence or a target coding sequence in the pest when introduced thereto. Transgenic plants that (a) contain nucleotide sequences encoding the isolated and substantially purified nucleic acid molecules and the non-naturally occurring recombinant DNA constructs for transcribing the dsRNA or siRNA molecules for controlling plant pest infestations, and (b) display resistance and/or enhanced tolerance to the insect infestations, are also provided Compositions containing the dsRNA nucleotide sequences of the present invention for use in topical applications onto plants or onto animals or into the environment of an animal to achieve the elimination or reduction of pest infestation are also described

Background of the Invention

The environment in which humans live is replete with pest infestation Pests including insects, arachnids, crustaceans, fungi, bacteria, viruses, nematodes, flatworms, roundworms, pinworms, hookworms, tapeworms, trypanosomes, schistosomes, botflies, fleas, ticks, mites, and lice and the like are pervasive in the human environment, and a multitude of means have been utilized for attempting to control infestations by these pests. Compositions for controlling infestations by microscopic pests such as bacteria, fungi, and viruses have been provided in the form of antibiotic compositions, antiviral compositions, and antifungal compositions. Compositions for controlling infestations by larger pests such as nematodes, flatworm, roundworms, pinworms, heartworms, tapeworms, trypanosomes, schistosomes, and the like have typically been in the form of chemical compositions which can either be applied to the surfaces of substrates on which pests are known to infest, or to be ingested by an infested animal in the form of pellets, powders, tablets, pastes, or capsules and the like. The

present invention is directed to providing an improved means for controlling pest infestation compared to the compositions known in the art

Commercial crops are often the targets of insect attack Substantial progress has been made in the last a few decades towards developing more efficient methods and compositions for controlling insect infestations in plants Chemical pesticides have been very effective in eradicating pest infestations However, there are several disadvantages to using chemical pesticidal agents Chemical pesticidal agents are not selective Applications of chemical pesticides are intended to control invertebrate pests that are harmful to various crops and other plants However, because of the lack of selectivity, the chemical pesticidal agents exert their effects on non-target fauna as well, often effectively sterilizing a field for a period of time over which the pesticidal agents have been applied Chemical pesticidal agents persist in the environment and generally are slow to be metabolized, if at all They accumulate in the food chain, and particularly in the higher predator species Accumulations of these chemical pesticidal agents results in the development of resistance to the agents and in species higher up the evolutionary ladder, act as mutagens and/or carcinogens often causing irreversible and deleterious genetic modifications Thus there has been a long felt need for environmentally friendly methods for controlling or eradicating insect infestation on or in plants i e methods which are selective, environmentally inert, non-persistent, and biodegradable, and that fit well into pest resistance management schemes

Compositions that include *Bacillus thuringiensis* (B t) bacteria have been commercially available and used as environmentally safe and acceptable insecticides for more than thirty years The insecticidal effect of Bt bacteria arises as a result of proteins that are produced exclusively by these bacteria that do not persist in the environment that are highly selective as to the target species affected exert their effects only upon ingestion by a target pest, and have been shown to be harmless to plants and other non-targeted organisms including humans Transgenic plants containing one or more genes encoding insecticidal B t protein are also available in the art and are remarkably efficient in controlling insect pest infestation A substantial result of the use of recombinant plants expressing Bt insecticidal proteins is a marked decrease in the amount of chemical pesticidal agents that are applied to the environment to control pest infestation in crop fields in areas in which such transgenic crops are used The decrease in application of chemical pesticidal agents has resulted in cleaner soils and cleaner waters running off of the soils into the surrounding streams rivers, ponds and lakes In addition to these environmental benefits there has been a noticeable increase in the numbers of beneficial insects in crop fields in which transgenic insect resistant crops are grown because of the decrease in the use of chemical insecticidal agents

The adventitious use of recombinant plants expressing an insecticidal crystal protein toxin has strengthened the concern about the spontaneous development of resistance to the toxin in the target pest population One means for delaying or eliminating the onset of resistance in the pest population is to combine the recombinant toxin with a second means for controlling the pests in which the second means exerts its effects through a different mode of action in comparison to the recombinant toxin One means for deploying two or more toxins would be to incorporate a seed treatment containing some insecticidal composition that is effective at very low doses and which infuses into the soil or into the growing recombinant plant after sprouting This means has been shown to be effective and economical but has the disadvantage of subjecting the environment to a chemical pesticide that may accumulate in the food chain and that may persist in the environment Another means would be to deploy a recombinant plant that expresses at least two different insecticidal toxins each

toxin being toxic to the same insect pest, and each toxin exerting its effects through a different mode of action In the short term this second approach is cost effective and likely sufficient to delay the development of resistance in the pest population However there may be at least two disadvantages to this approach as well One disadvantage is that any development of resistance to one of the insecticidal toxins deployed into the environment of the pest immediately increases the likelihood that resistance could develop sooner than anticipated to a second or even a third toxin Also there is a limited number of insecticidal crystal protein toxins that are toxic to the same insect pest that are available for use that, when combined with another insecticidal protein would fall within the defined scope of exerting its effects through a different mode of action than toxins presently in use Therefore additional compositions and methods for controlling pest infestation are needed, and in particular, methods and compositions are needed for use in delaying or minimizing the development of resistance to present pest control agents

Chemical pesticidal agents typically exert their effects by inhibiting one or more proteins within the target pest either by binding irreversibly to an active site within a particular protein, by inhibiting the protein from acting upon a naturally occurring substrate, or by poisoning a respiratory or chemical gradient pathway Recombinant methods and compositions have typically targeted cell membrane systems by producing proteins that, upon ingestion by a pest, introduce pores that result in the loss of chemical or other gradients across disrupted cell membranes Other than chemical compositions that directly exert their effects upon proteins involved in transcription or translation mechanisms, no method has been reported for controlling pest infestation by inhibiting in the target pest the production of essential proteins through RNA mediated interference by providing one or more double stranded RNA molecules in the diet of the pest

Antisense methods and compositions have been reported in the art and are believed to exert their effects through the synthesis of a single-stranded RNA molecule that in theory hybridizes *in vivo* to a substantially complementary sense strand RNA molecule It is believed that the antisense methods function in much the same way as double stranded RNA mediated interference methods are believed to function, except that the effectiveness of the antisense response is often substantially less than desirable, intermittent, or not evident at all Furthermore, there has never been a report in which antisense was contemplated as a means for suppressing expression of a gene in a cell remote from the cell or biological system in which the antisense sequence was expressed Antisense technology has only been applied as a means for achieving gene-specific interference of expression within the cell or biological system in which the antisense sequence is expressed Antisense technology has been difficult to employ in many systems for three principle reasons First, the antisense sequence expressed in the transformed cell is unstable Second, the instability of the antisense sequence expressed in the transformed cell concomitantly creates difficulty in delivery of the sequence to a host cell type or biological system remote from the transgenic cell Third, the difficulties encountered with instability and delivery of the antisense sequence create difficulties in attempting to provide a dose within the recombinant cell expressing the antisense sequence that can effectively modulate the level of expression of the target sense nucleotide sequence

The phenomenon of double-stranded RNA (dsRNA) induced silencing has been known for a number of years in plant systems One form of dsRNA induced silencing is referred to as co-suppression and as virus-induced gene silencing (VIGS) and is reviewed in Matzke et al (Adv Genet 2002, 46 235-275) Co-suppression and VIGS effects in recombinant plant systems were observed but unexplained before dsRNA was

identified in animal systems as the trigger for induction of the evolutionarily conserved mechanism of gene suppression Guo et al first observed that the use of sense RNA as a control was as effective as antisense RNA in specific silencing of a targeted gene in *C elegans* (Guo et al 1995, Cell *81* 611-620) Fire et al suspected that the single stranded RNA preparations used by Guo et al were contaminated with dsRNA and subsequently demonstrated that dsRNA was a much more potent trigger than single stranded RNA for achieving gene specific silencing The observations by Fire et al distinguished the physical attribute of double stranded RNA suppression from antisense suppression (Fire et al , 1998 Nature *391* 806-811) It is believed that the post-transcriptional gene silencing effects observed in plants (Jorgensen 1990, Trends Biotechnol 8 340-344) and the quelling effect in fungi (Romano et al , 1992, Mol Microbiol 6 3343-3353, Bernstein et al , 2001, RNA 7 1509-1521) using single stranded RNA is a result of contamination of samples with double stranded RNA sequences (Dykxhoorn et al , 2003, Nature Reviews 4 457-467 Hannon et al , 2002, Nature 418 244-251) It is now clear, however, that double stranded RNA mediated inhibition of gene expression, co-suppression, and virus-induced gene silencing are triggered by dsRNA and operate by similar mechanisms (Stevenson, 2003 Nature Reviews 3 851-858, Bernstein et al , 2001, RNA 7 1509-1521)

The lack of understanding of the specific mechanisms involved in these phenomena has meant that there have been few improvements in technologies for modulating the level of gene expression within a cell tissue or organism and in particular, a lack of developed technologies for delaying repressing or otherwise reducing the expression of specific genes using recombinant DNA technology Furthermore, as a consequence of the unpredictability of these approaches no commercially viable means for modulating the level of expression of a specific gene in a eukaryotic or prokaryotic organism is available

Double stranded RNA mediated inhibition of specific genes in various pests has been previously demonstrated dsRNA mediated approaches to genetic control have been tested in the fruit fly *Drosophila melanogaster* (Tabara et al , 1998, Science 282 430-431) Tabara et al describe a method for delivery of dsRNA involved generating transgenic insects that express double stranded RNA molecules or injecting dsRNA solutions into the insect body or within the egg sac prior to or during embryonic development Research investigators have previously demonstrated that double stranded RNA mediated gene suppression can be achieved in nematodes either by feeding or by soaking the nematodes in solutions containing double stranded or small interfering RNA molecules and by injection of the dsRNA molecules Rajagopal et al described failed attempts to suppress an endogenous gene in larvae of the insect pest *Spodoptera litura* by feeding or by soaking neonate larvae in solutions containing dsRNA specific for the target gene, but was successful in suppression after larvae were injected with dsRNA into the hemolymph of 5th instar larvae using a microapplicator (J Biol Chem 2002 277 46849-46851) Similarly, Mesa et al (US 2003/0150017) prophetically described a preferred locus for inhibition of the lepidopteran larvae *Helicoverpa armigera* using dsRNA delivered to the larvae by ingestion of a plant transformed to produce the dsRNA It is believed that it would be impractical to provide dsRNA molecules in the diet of most invertebrate pest species or to inject compositions containing dsRNA into the bodies of invertebrate pests The diet method of providing dsRNA molecules to invertebrate pests is impractical because RNA molecules, even stabilized double stranded RNA molecules, are in effect highly unstable in mildly alkaline or acidic environments such as those found in the digestive tracts of most invertebrate pests and easily degraded by nucleases in the environment Therefore it is unlikely that feeding dsRNA to a lepidopteran larvae having a digestive tract pH in the extreme alkaline range would result in the

suppression of any gene within the cells of the larvae It would also be impractical to formulate compositions containing dsRNA molecules such as recombinant bacteria expressing such dsRNA molecules as a food source for nematodes, that could be applied to broad expanses of soil to control invertebrate pest infestations of crop plants

Therefore, there exists a need for improved methods of modulating gene expression by repressing, delaying or otherwise reducing gene expression within a particular invertebrate pest for the purpose of controlling pest infestation or to introduce novel phenotypic traits

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention, in one embodiment, comprises a method of inhibiting expression of a target gene in an invertebrate pest Specifically the present invention comprises a method of modulating or inhibiting expression of one or more target genes in an invertebrate pest, in particular, in Western corn rootworm (WCR, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) and the like, that cause cessation of feeding, growth, development reproduction and infectivity and eventually result in the death of the insect The method comprises introduction of partial or fully, stabilized double-stranded RNA (dsRNA) or its modified forms such as small interfering RNA (siRNA) sequences into the cells or into the extracellular environment, such as the midgut, within an invertebrate pest body wherein the dsRNA or siRNA enters the cells and inhibits expression of at least one or more target genes and wherein inhibition of the one or more target genes exerts a deleterious effect upon the invertebrate pest It is specifically contemplated that the methods and compositions of the present invention will be useful in limiting or eliminating invertebrate pest infestation in or on any pest host, pest symbiont or environment in which a pest prefers by providing one or more compositions comprising dsRNA molecules in the diet of the pest so long as the pest digestive system pH is within the range of from about 4 5 to about 9 5 from about 5 to about 9, from about 6 to about 8, and from about pH 7 0

The present application discloses an exemplary sequence listing containing the both the nucleotide and amino acid sequences from Western Corn Rootworm (WCR *Diabrotica virgifera*), as set forth in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 and SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 and from other coleopteran insects including Colorado Potato Beetle (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*) and Red Flour Beetle (RFB *Tribolium castaneum*), from lepidopteran insects including European Corn Borer (ECB, *Ostrinia nubilalis*), Black Cutworm (BCW, *Agrotis ipsilon*), Corn Earworm (CEW, *Helicoverpa zea*), Fall Armyworm (FAW *Spodoptera frugiperda*), Cotton Ball Weevil (BWV, *Anthonomus grandis*), silkworms (*Bombyx mori*) and *Manduca sexta* and from Dipteran insects including *Drosophila melanogaster Anopheles gambiae*, and *Aedes aegypti*, as set forth in SEQ ID NO 144 through SEQ ID NO 159 The sequence listing is included along with the paper copy of this application on one CD-ROM diskette

The computer readable form at file corresponding to the sequence listing contains the sequence listing information for corn rootworm Unigene sequences, EST sequences, corn rootworm specific probe sequences primer sequences, amplicon sequences, and sequences encoding double stranded RNA sequences and the v-ATPase and ribosomal protein L19 orthologs from other insects as described above (SEQ ID NO 144 through SEQ ID NO 159)

The present invention provides a method for suppression of gene expression in an invertebrate pest such as a corn rootworm or related species comprises the step of providing in the diet of the pest a gene

suppressive amount of at least one dsRNA molecule transcribed from a nucleotide sequence as set forth in , SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 and SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 in the sequence listing, at least one segment of which is complementary to an mRNA sequence formed within the cells of the pest, and observing the death, inhibition, stunting, or cessation of feeding of the pest .

In another aspect of the present invention, the method comprises the step of feeding to the pest one (or more) stabilized dsRNA molecules or its modified form such as an siRNA molecule the nucleotide sequence of which is at least from about 80 81, 82, 83, 84 85, 86, 87, 88 89, 90 91 92, 93, 94 95 96 97, 98, 99 or about 100% identical to an RNA molecule transcribed from a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 and SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174

Accordingly, in another aspect of the present invention, a set of isolated and purified nucleotide sequences as set forth in , SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143, and SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing is provided The nucleotide sequences disclosed herein as set forth in and SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 were isolated and substantially purified from complementary DNA (cDNA) libraries, made from WCR insect larvae The nucleotide sequences disclosed herein as set forth in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 in the sequence listing were isolated and substantially purified from the genomic DNA of the Southern corn rootworm insect pest, or from mRNA pools isolated from the insect pest from cDNA nucleotide sequences derived from such mRNA pools, or synthesized denovo based on nucleotide sequences disclosed herein or known in the art as T7 phage RNA polymerase promoter sequences The present invention provides a stabilized dsRNA or siRNA molecule or the expression of one or more miRNAs for inhibition of expression of a target gene in an invertebrate pest such as a WCR insect A stabilized dsRNA, miRNA or siRNA molecule can comprise at least two coding sequences that are arranged in a sense and an antisense orientation relative to at least one promoter wherein the nucleotide sequence that comprises a sense strand and an antisense strand are linked or connected by a spacer sequence of at least from about five to about one thousand nucleotides, wherein the sense strand and the antisense strand are different in length, and wherein each of the two coding sequences shares at least 80% sequence identity at least 90%, at least 95%, at least 98%, or even 100% sequence identity, to a nucleotide sequence as set forth in one of , SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in one of SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 in the sequence listing

The invention also provides non-naturally occurring (NNO) nucleotide sequences that may be used to target genes in the invertebrate pest for double stranded RNA mediated suppression in order to achieve desired inhibition of the target genes Any one of the nucleotide sequences as set forth in , and SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 may be used to construct such a NNO nucleotide sequence

The present invention also provides a recombinant DNA construct encoding the dsRNA molecules contemplated herein for introduction into a host cell The recombinant DNA construct comprises a nucleotide sequence that is transcribed into RNA by the host cell The transcribed RNA forms at least one dsRNA molecule, such that one strand of the dsRNA molecule is coded by a portion of the nucleotide sequence which is at least from about 80% to about 100% identical to a nucleotide sequence selected from the group consisting of and SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 and SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 The recombinant DNA construct is capable of producing dsRNA molecules in the host cell and inhibiting the expression of the endogenous gene or the target gene or a derivative thereof or a complementary sequence thereto in the host cell,

or in a pest cell upon ingestion of the transformed host cell by an invertebrate pest A nucleotide sequence of the present invention is placed under the control of a promoter sequence that is operable in the host cell and expressed to produce ribonucleic acid sequences that form dsRNA molecules within the host cell The dsRNA molecules may be further processed either in the host cell or in an invertebrate pest to form siRNA molecules

The present invention also provides a recombinant DNA sequence for plant transformation constructed to contain at least one non-naturally occurring nucleotide sequence that can be transcribed into a single stranded RNA molecule The single stranded RNA molecule forms a double stranded RNA molecule in vivo through intermolecular hybridization that when provided in the diet of an invertebrate pest, inhibits the expression of at least one target gene in a cell of the invertebrate pest The non-naturally occurring nucleotide sequence is operably linked to at least one promoter sequence that functions in a transgenic plant cell to transcribe the operably linked non-naturally occurring nucleotide sequence into one or more ribonucleic acid sequences The RNA sequences self assemble into double stranded RNA molecules and are provided in the diet of an invertebrate pest that feeds upon the transgenic plant The provision of the dsRNA molecules in the diet of the pest achieves the desired inhibition of expression of one or more target genes within the pest

The present invention also provides a recombinant host cell having in its genome at least one recombinant DNA sequence that is transcribed in the host cell to produce at least one dsRNA molecule that functions when ingested by an invertebrate pest to inhibit the expression of a target gene in the pest The dsRNA molecule is coded by a portion of a nucleotide sequence that exhibits at least from about 80 to about 100% identity to a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 in the sequence listing Exemplary nucleotide sequences for use in constructing dsRNA agents that target WCR genes for suppression are as set forth in , SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 and SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 in the sequence listing

The present invention also provides a recombinant DNA construct for plant transformation that consists of at least two different non-naturally occurring sequences which when expressed in vivo as RNA sequences and provided in the diet of an invertebrate pest, inhibit the expression of at least two different target genes in the cell of the invertebrate pest The first non-naturally occurring sequence is transcribed into RNA that forms at least one first dsRNA molecule One portion of the first dsRNA molecule is encoded by a portion of the first non-naturally occurring sequence and exhibits at least from about 80 to about 100% identity to at least one of the nucleotide sequences as set forth in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 in the sequence listing, and to the nucleotide sequence of the first target gene, derivative thereof or sequence complementary thereto The second non-naturally occurring sequence is transcribed into RNA that forms a second dsRNA molecule One portion of the second dsRNA molecule is encoded by a portion of the second non-naturally occurring sequence and exhibits at least from about 80 to about 100% identity to a nucleotide sequence selected from the group as set forth in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 and in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 in the sequence listing and to the nucleotide sequence of the second target gene derivative thereof or sequence complementary thereto The two non-naturally occurring sequences are placed operably under the control of at least one promoter sequence The promoter sequence functions to express the first and second dsRNA molecules in the transgenic plant cell The dsRNA molecules are provided in a pest inhibitory concentration in the diet of an invertebrate pest feeding on the transgenic plant,

and ingestion of plant cells by the pest achieves the desired inhibition of expression of the target genes in the pest

The present invention also provides a transformed plant cell having in its genome at least one of the aforementioned recombinant DNA sequences for plant transformation Transgenic plants are generated from the transformed plant cell and progeny plants seeds and plant products each comprising the recombinant DNA, are produced from the transgenic plants

The methods and compositions of the present invention may be applied to any monocot and dicot plant depending on the invertebrate pest control desired, or may be applied to through pharmaceutically acceptable formulations to vertebrate animals in order to provide some level of reduction of invertebrate pest infestation Specifically the plants are intended to comprise without limitation alfalfa, aneth, apple, apricot artichoke, arugula, asparagus avocado banana barley beans beet blackberry, blueberry, broccoli, brussel sprouts, cabbage, canola, cantaloupe, carrot, cassava, cauliflower, celery, cherry, cilantro citrus, clementine, coffee, corn cotton cucumber, Douglas fir, eggplant, endive, escarole eucalyptus, fennel figs gourd, grape grapefruit, honey dew, jicama kiwifruit, lettuce, leeks lemon, lime, Loblolly pine, mango, melon mushroom nut, oat, okra, onion, orange, an ornamental plant, papaya, parsley, pea, peach, peanut, pear, pepper, persimmon, pine, pineapple, plantain, plum, pomegranate poplar, potato, pumpkin, quince, radiata pine, radicchio, radish raspberry, rice, rye, sorghum, Southern pine, soybean, spinach squash, strawberry, sugarbeet, sugarcane sunflower sweet potato sweetgum, tangerine, tea, tobacco, tomato, turf, a vine, watermelon, wheat yams, and zucchini plants

The present invention also provides a pest control agent comprising a dsRNA molecule transcribed from a nucleotide sequence of the present invention The nucleotide sequence shares at least from about 80 to about 100% sequence identity to at least one of the nucleotide sequences as set forth in in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 in the sequence listing In one form, the pest control agents comprise dsRNA molecules In another form, the pest control agents comprise siRNA molecules In still another form, the pest control agents comprise recombinant DNA sequences that encode mRNA molecules that form the dsRNA or siRNA molecules for introduction into plants and microbes In yet another form, the pest control agents are microbes that contain recombinant DNA sequences that encode the RNA molecules that form the dsRNA or siRNA molecules The pest control agent is preferably an insect or a nematode pest control agent

It is intended that the pest control agent act to reduce or eliminate infestation of a corn rootworm, but it is also contemplated that the methods and compositions set forth herein are capable of being utilized to derive related sequences from other pests and utilize those derivatives for controlling infestation of the other pest(s) It is further contemplated that the insect pest may be selected from any genus, family, or order of insect For corn rootworms, it is contemplated that the pest be selected from the same genus same family, or order to which a corn rootworm belongs Further, the present inventors contemplate that the present invention may be used and applied to control any species from the insect kingdom and from nematodes fungal pathogens, virus, bacteria and any other invertebrate plant pests

The invention also provides combinations of methods and compositions for controlling invertebrate pest infestations One means provides the dsRNA methods and compositions described herein for protecting plants from insect infestation along with one or more insecticidal agents that exhibit features different from

those exhibited by the dsRNA methods and compositions For example when Bt proteins are provided in the diet of insect pests a mode of action for controlling the insect pest is exhibited that is dramatically different from the mode of action of the methods and compositions of the present invention A composition either formulated for topical application or one derived using a transgenic approach that combines dsRNA methods and compositions with Bt methods and compositions results in synergies that were not known previously in the art for controlling insect infestation Transgenic plants that produce one or more dsRNA or siRNA molecules that inhibit some essential biological function in a target pest along with one or more B t insecticidal proteins that are toxic to the target pest provide surprising synergies One synergy is the reduction in the level of expression required for either the dsRNA(s) or the Bt protein(s) When combined together, a lower effective dose of each pest control agent is required It is believed that the Bt insecticidal proteins create entry pores through which the dsRNA or siRNA molecules are able to penetrate more effectively into spaces remote from the gut of the insect pest or more efficiently into the cells in the proximity of lesions created by the Bt proteins thus requiring less of either the Bt or the dsRNA to achieve the desired insecticidal result or the desired inhibition or suppression of a targeted biological function in the target pest

The inventors herein describe a plurality of inventions, including a method for controlling invertebrate pest infestations by providing a diet to an invertebrate pest an agent comprising or consisting of a ribonucleic acid that functions upon ingestion by the pest to inhibit the expression of a target nucleotide sequence that is within the cells of the pest The ribonucleic acid that is provided in the diet consists of a ribonucleotide sequence that is or that is complementary to, the target nucleotide sequence The ribonucleotide sequence is transcribed from a contiguous DNA sequence that is at least from about 19 to about 5000 nucleotides in length and that is selected from the group consisting of SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143, SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174, and the complement thereof The method provides for the construction of a nucleotide sequence that can be used to express an RNA molecule that can be ingested by the pest in a diet provided to the pest The diet can be an artificial diet formulated to meet the particular nutritional requirements for maintaining a pest on such diet, and be supplemented with a pest controlling amount of the RNA that has been purified from a separate expression system, the supplementation of the diet being for the purpose of determining the pest controlling amount of the RNA composition or determing whether one or more particular RNA's constructed specifically to bind or hybridize in part to one or more target sequences within the pest are functional in achieving some gene suppressive activity upon ingestion of the supplemented diet by the pest The diet can also be a recombinant cell transformed with a DNA sequence constructed for expression of the agent the RNA, or the gene suppression agent Upon ingestion of one or more such transformed cells by the pest, a desired genotypic or phenotypic result is observed, indicating that the agent has functioned to inhibit the expression of a target nucleotide sequence that is within the cells of the pest

The invertebrate pest is preferably an insect, an arachnid, a nematode, a platyhelminthe, an aschelminthe, a fungal pest, or any other invertebrate pest for which the gene suppression technology is amenable More preferably, the invertebrate pest is one that is particularly problematic in terms of infestation of animals or plants More particularly the invertebrate pest is an insect or a nematode or a fungal pest that preferentially infests crop plants ornamentals, and/or grasses

A DNA sequence that is selected for use in expression of a gene suppression agent of the present invention is preferably at least about 19 to about 5000 nucleotides in length, and is at least in part substantially identical in sequence to the sense or the antisense strand of a target sequence present in the DNA of one or more particular target pest species The phrase "at least in part" is intended to refer to the concept that the DNA sequence selected for use in expression of a gene suppression agent can be constructed from a single sequence derived from one or more target pests and intended for use in expression of an RNA that functions in the suppression of a single gene or gene family in the one or more target pests or that the DNA sequence can be constructed as a chimera from a plurality of DNA sequences The plurality of DNA sequences can be each be derived from one or more nucleotide sequences from within a single pest, or can be derived one or more nucleotide sequences from a plurality of different pests In particular the selected sequence should exhibit from about 80 to about 100% nucleotide sequence identity to a nucleotide sequence from the DNA of the pest species The DNA of the pest species can be identified by directly isolating the DNA from the pest species or by identification of RNA sequences within the pest species and reverse translating the RNA sequences to DNA Sequences exemplifying DNA from corn rootworm pest species are set forth herein in the sequence listing as SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143, SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174, and the complements thereof

The DNA sequences selected for use in expression of a gene suppressive RNA molecule can be included in a polynucleotide composition for use in a plant cell In particular the DNA sequences can be incorporated into a vector for use in transforming the genome of a plant cell, and can be incorporated into an expression cassette containing at least a plant functional promoter operably linked to the selected DNA sequence along with any other expression control elements desired to achieve an appropriate cellular temporal or plant spatial level of expression The introduction of the polynucleotide composition into the genome of a plant cell provides a transformed cell that can be selected, providing that appropriate selective means have been included along with the polynucleotide composition, and regenerated into a transgenic recombinant plant The transgenic plant, an event can be provided in the diet of the pest or pests to achieve control of a pest infestation The transgenic plant can give rise to progeny plants, plant cells, and seeds each containing the polynucleotide composition

The present invention provides a method for protecting a plant from insect infestation by providing to the insect pest one or more of the plants' cells each expressing a gene suppressive RNA molecule from a DNA sequence that is selected from the group consisting of the sequences exemplified herein The ingestion of the plant cells containing the gene suppressive RNA, the pest or insect control agent, results in the inhibition of one or more biological functions in the pest or insect

The present invention provides a composition that contains two or more different pesticidal agents each toxic to the same pest or insect species As indicated herein, one of these pesticidal agents can be a RNA molecule that functions to suppress an essential biological function in one or more cells of the pest A second pesticidal agent can be included along with the first The second agent can be a second gene suppressive RNA that is different from the first, or the second agent can be an agent selected from the group consisting of a patatin, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein, a *Xenorhabdus* insecticidal protein, a *Photorhabdus* insecticidal protein, a *Bacillus laterosporous* insecticidal protein, a *Bacillus sphearicus* insecticidal protein and a lignin A *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein can be any of a number of insecticidal proteins including

but not limited to a Cry1, a Cry3 a TIC851 a CryET70 a Cry22 a binary insecticidal protein CryET33 and CryET34, a binary insecticidal protein CryET80 and CryET76 a binary insecticidal protein TIC100 and TIC101, a binary insecticidal protein PS149B1, a VIP insecticidal protein, a TIC900 or related protein, a TIC901 TIC1201 TIC407, TIC417, and insecticidal chimeras of any of the preceding insecticidal proteins

The gene targeted for suppression, or the function in a pest cell or as a physiological or metatabooic aspect of the pest that is enabled by the expression of the gene targeted for suppression, can encode an essential protein, the predicted function of which is selected from the group consisting of muscle formation juvenile hormone formation, juvenile hormone regulation, ion regulation and transport digestive enzyme synthesis, maintenance of cell membrane potential, amino acid biosynthesis, amino acid degradation, sperm formation, pheromone synthesis, pheromone sensing, antennae formation wing formation, leg formation, development and differentiation, egg formation larval maturation, digestive enzyme formation haemolymph synthesis, haemolymph maintenance, neurotransmission cell division, energy metabolism respiration and apoptosis It is preferred that the DNA sequence selected for constructing the suppression construct be derived from the nucleotide sequences set forth in the sequence listing for suppression of a corn rootworm gene It is envisioned that the method for controlling invertebrate pest infestation will include providing in the diet of the invertebrate pest an agent for example, a first ribonucleotide sequence expressed from a first DNA sequence that functions upon ingestion by the pest to inhibit a biological function within said pest, and that the first DNA sequence exhibits from about 85 to about 100% nucleotide sequence identity to a coding sequence derived form said pest The first ribonucleotide sequence may be hybridized to a second ribonucleotide sequence that is complimentary or substantially complimentary to the first ribonucleotide sequence and the second ribonucleotide sequence is expressed from a second DNA sequence that corresponds to a coding sequence derived from the invertebrate pest, selected from the sequences set forth herein in the sequence listing, or the complements thereof It is preferred that the first and the second DNA sequence comprise a contiguous sequence of identity to one or more of the sequences set forth in the sequence listing and be from about 14 to about 25 or more contiguous nucleotides

The invention functions at optimum when a diet containing a pest gene suppressive amount of an insecticidal agent such as one or more RNA molecules produced from the expression of one or more sequences set forth herein in the sequence listing are provided to an invertebrate pest that exhibits a digestive system pH that is from about 4 5 to about 9 5 or from about 5 0 to about 9 0, or from about 5 5 to about 8 5 or from about 6 0 to about 8 0, or from about 6 5 to about 7 0, or about 7 0 Any of the methods nucleic acids, ribonucleic acids ribonucleotide sequences, compositions, plants, plant cells, progeny plants, seeds, insect control agents, pest control agents expression cassettes, described herein are optionally functional when provided in a diet to one or more pests that comprise such a digestive tract pH

The diet of the present invention can be any pest sufficient diet including but not limited to an artificial diet or formulation a plant cell, a plurality of plant cells, a plant tissue, a plant root, a plant seed, and a plant grown from a plant seed, wherein the diet comprises a pest inhibitory amount of an RNA molecule encoded from a DNA sequence that is or is complimentary to or is substantially or is substantially complimentary to one or more contiguous at least from about 19 to about 5000 nucleotides selected from the nucleotide sequences set forth in the sequence listing or selected from nucleotide sequences derived from a particular invertebrate pest species

Agronomically and commercially important products and/or compositions of matter including but not limited to animal feed, commodities, and corn products and by-products that are intended for use as food for human consumption or for use in compositions and commodities that are intended for human consumption including but not limited to corn flour, corn meal, corn syrup, corn oil, corn starch, popcorn, corn cakes, cereals containing corn and corn by-products, and the like are intended to be within the scope of the present invention if these products and compositions of matter contain detectable amounts of the nucleotide sequences set forth herein as being diagnostic for any transgenic event containing such nucleotide sequences These products are useful at least because they are likely to be derived from crops and produce that are propagated in fields containing fewer pesticides and organophosphates as a result of their incorporation of the nucleotides of the present invention for controlling the infestation of invertebrate pests in plants Such commodities and commodity products are produced from seed produced from a transgenic plant, wherein the transgenic plant expresses RNA from one or more contiguous nucleotides of the present invention or nucleotides of one or more invertebrate pests and the compliments thereof Such commodities and commodity products may also be useful in controlling invertebrate pests of such commodity and commodity products, such as for example, control of flour weevils because of the presence in the commodity or commodity product of the pest gene suppressive RNA expressed from a gene sequence as set forth in the present invention

The invention also provides a computer readable medium having recorded thereon one or more of the nucleotide sequences as set forth in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing or complements thereof, for use in a number of computer based applications, including but not limited to DNA identity and similarity searching, protein identity and similarity searching, transcription profiling characterizations, comparisons between genomes, and artificial hybridization analyses

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The following is a detailed description of the invention provided to aid those skilled in the art in practicing the present invention Those of ordinary skill in the art may make modifications and variations in the embodiments described herein without departing from the spirit or scope of the present invention

The inventors have herein discovered that, contrary to the teachings in the prior art, feeding a composition containing double stranded RNA molecules consisting of sequences found within one or more expressed nucleotide sequences of an invertebrate species to the invertebrate species from which the nucleotide sequences were obtained results in the inhibition of one or more biological functions within the invertebrate species Particularly the inventors have discovered that feeding double stranded RNA molecules consisting of corn rootworm RNA sequences respectively to corn rootworms or lygus bugs surprisingly results in the death or inhibition of development and differentiation of the corn rootworms that ingest these compositions

The inventors have identified the nucleotide sequence of thousands of cDNA sequences obtained from each of the invertebrate pest species Amino acid sequences as set forth in encoded by the cDNA sequences were deduced and compared to all known amino acid sequences Many of the cDNA sequences are predicted to encode proteins that have some annotation information associated with them The annotation information that is associated with a particular nucleotide sequence and protein sequence encoded therefrom is based on homology or similarity between the amino acid sequences deduced through translation of the cDNA sequences described

herein as set forth in and amino acid sequences that are known in the art in publicly available databases The deduced amino acid sequences as set forth herein were BLASTX-ed against all known amino acid sequences, and likely functionalities of each of the deduced amino acid sequences were assigned based on the alignment results cDNA sequences encoding proteins or parts of proteins known in the art to be essential for survival, such as amino acid sequences involved in various metabolic or catabolic biochemical pathways, cell division, reproduction, energy metabolism, digestion, neurological function and the like were selected for use in preparing double stranded RNA molecules that were provided in the diet of an invertebrate pest As described herein ingestion by a target pest of compositions containing one or more dsRNA's, at least one segment of which corresponds to at least a substantially identical segment of RNA produced in the cells of the target pest resulted in death, stunting or other inhibition of the target pest These results indicated that a nucleotide sequence, either DNA or RNA, derived from an invertebrate pest can be used to construct a recombinant pest host or symbiont that is a target for infestation by the pest The pest host or symbiont can be transformed to contain one or more of the nucleotide sequences derived from the invertebrate pest The nucleotide sequence transformed into the pest host or symbiont encodes one or more RNA's that form into a dsRNA sequence in the cells or biological fluids within the transformed host or symbiont thus making the dsRNA available in the diet of the pest if/when the pest feeds upon the transgenic host or symbiont resulting in the suppression of expression of one or more genes in the cells of the pest and ultimately the death, stunting or other inhibition of the pest

The present invention relates generally to genetic control of invertebrate pest infestations in host organisms More particularly, the present invention includes the methods for delivery of pest control agents to an invertebrate pest Such pest control agents cause, directly or indirectly, an impairment in the ability of the pest to maintain itself grow or otherwise infest a target host or symbiont The present invention provides methods for employing stabilized dsRNA molecules in the diet of the pest as a means for suppression of targeted genes in the pest, thus achieving desired control of pest infestations in or about the host or symbiont targeted by the pest Transgenic plants can be produced using the methods of the present invention that express recombinant stabilized dsRNA or siRNA molecules

In accomplishing the foregoing, the present invention provides a method of inhibiting expression of a target gene in an invertebrate pest, and in particular, in Western corn rootworm (WCR) or other coleopteran insect species resulting in the cessation of feeding, growth, development, reproduction, infectivity and eventually may result in the death of the pest The method comprises introducing partial or fully, stabilized double-stranded RNA (dsRNA) nucleotide molecules or their modified forms such as small interfering RNA (siRNA) molecules into a nutritional composition that the pest relies on as a food source, and making the nutritional composition available to the pest for feeding Ingestion of the nutritional composition containing the double stranded or siRNA molecules results in the uptake of the molecules by the cells of the pest, resulting in the inhibition of expression of at least one target gene in the cells of the pest Inhibition of the target gene exerts a deleterious effect upon the pest dsRNA molecules or siRNA molecules consist of nucleotide sequences as set forth in any of SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 and SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174, the inhibition of which results in the reduction or removal of a protein or nucleotide sequence agent that is essential for the pests growth and development or other biological function The nucleotide sequence selected exhibits from about 80% to at least about 100% sequence identity to one of the nucleotide sequences as set forth in ,

SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 and SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing, or the complement thereof Such inhibition is specific in that a nucleotide sequence from a portion of the target gene is chosen from which the inhibitory dsRNA or siRNA is transcribed The method is effective in inhibiting the expression of at least one target gene and can be used to inhibit many different types of target genes in the pest

The present invention also provides different forms of the pest control agents to achieve the desired reduction in pest infestation In one form, the pest control agents comprise dsRNA molecules In another form, the pest control agents comprise siRNA molecules In still another form, the pest control agents comprise recombinant DNA constructs that can be used to stably transform microorganisms or plants, enabling the transformed microbes or plants to encode the dsRNA or siRNA molecules In another form, the pest control agents are microbes that contain the recombinant DNA constructs encoding the dsRNA or siRNA molecules

Pairs of isolated and purified nucleotide sequences are provided from cDNA library and/or genomic library information The pairs of nucleotide sequences are derived from any preferred invertebrate pest for use as thermal amplification primers to generate the dsRNA and siRNA molecules of the present invention

The present invention provides recombinant DNA constructs for use in achieving stable transformation of particular host or symbiont pest targets Transformed host or symbiont pest targets express pesticidally effective levels of preferred dsRNA or siRNA molecules from the recombinant DNA constructs, and provide the molecules in the diet of the pest

The present invention also provides, as an example of a transformed host or symbiont pest target organism, transformed plant cells and transformed plants and their progeny The transformed plant cells and transformed plants express one or more of the dsRNA or siRNA sequences of the present invention from one or more of the DNA sequences as set forth in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 and SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing, or the complement thereof

As used herein the words gene suppression', when taken together are intended to refer to any of the well-known methods for reducing the levels of protein produced as a result of gene transcription to mRNA and subsequent translation of the mRNA Gene suppression is also intended to mean the reduction of protein expression from a gene or a coding sequence including posttranscriptional gene suppression and transcriptional suppression Posttranscriptional gene suppression is mediated by the homology between of all or a part of a mRNA transcribed from a gene or coding sequence targeted for suppression and the corresponding double stranded RNA used for suppression, and refers to the substantial and measurable reduction of the amount of available mRNA available in the cell for binding by ribosomes The transcribed RNA can be in the sense orientation to effect what is called co-suppression, in the anti-sense orientation to effect what is called anti-sense suppression, or in both orientations producing a dsRNA to effect what is called RNA interference (RNAi) Transcriptional suppression is mediated by the presence in the cell of a dsRNA, a gene suppression agent exhibiting substantial sequence identity to a promoter DNA sequence or the complement thereof to effect what is referred to as promoter *trans* suppression Gene suppression may be effective against a native plant gene associated with a trait, e g , to provide plants with reduced levels of a protein encoded by the native gene or with enhanced or reduced levels of an affected metabolite Gene suppression can also be effective against target genes in plant pests that may ingest or contact plant material containing gene suppression agents, specifically

designed to inhibit or suppress the expression of one or more homologous or complementary sequences in the cells of the pest

Post-transcriptional gene suppression by anti-sense or sense oriented RNA to regulate gene expression in plant cells is disclosed in U S Pat Nos 5,107 065, 5,759,829 5,283 184 and 5,231 020 The use of dsRNA to suppress genes in plants is disclosed in WO 99/53050, WO 99/49029, U S Patent Application Publication No 2003/0175965, and 2003/0061626, U S Patent Applications No 10/465 800, and U S Patents No 6,506,559, and 6,326 193

A preferred method of post transcriptional gene suppression in plants employs both sense-oriented and anti-sense-oriented, transcribed RNA which is stabilized, e g , as a hairpin and stem and loop structure A preferred DNA construct for effecting post transcriptional gene suppression one in which a first segment encodes an RNA exhibiting an anti-sense orientation exhibiting substantial identity to a segment of a gene targeted for suppression, which is linked to a second segment encoding an RNA exhibiting substantial complementarity to the first segment Such a construct would be expected to form a stem and loop structure by hybridization of the first segment with the second segment and a loop structure from the nucleotide sequences linking the two segments (see WO94/01550, WO98/05770, US 2002/0048814, and US 2003/0018993)

As used herein the term "nucleic acid" refers to a single or double-stranded polymer of deoxyribonucleotide or ribonucleotide bases read from the 5' to the 3' end The "nucleic acid" may also optionally contain non-naturally occurring or altered nucleotide bases that permit correct read through by a polymerase and do not reduce expression of a polypeptide encoded by that nucleic acid The term "nucleotide sequence" or 'nucleic acid sequence" refers to both the sense and antisense strands of a nucleic acid as either individual single strands or in the duplex The term 'ribonucleic acid' (RNA) is inclusive of RNAi (inhibitory RNA) dsRNA (double stranded RNA), siRNA (small interfering RNA) mRNA (messenger RNA), miRNA (micro-RNA) tRNA (transfer RNA, whether charged or discharged with a corresponding acylated amino acid) and cRNA (complementary RNA) and the term 'deoxyribonucleic acid' (DNA) is inclusive of cDNA and genomic DNA and DNA-RNA hybrids The words "nucleic acid segment", nucleotide sequence segment', or more generally 'segment" will be understood by those in the art as a functional term that includes both genomic sequences, ribosomal RNA sequences, transfer RNA sequences, messenger RNA sequences, operon sequences and smaller engineered nucleotide sequences that express or may be adapted to express, proteins, polypeptides or peptides

As used herein the term "pest" refers to insects, arachnids crustaceans, fungi, bacteria, viruses, nematodes flatworms, roundworms, pinworms, hookworms tapeworms, trypanosomes, schistosomes, botflies, fleas ticks mites and lice and the like that are pervasive in the human environment and that may ingest or contact one or more cells, tissues or fluids produced by a pest host or symbiont transformed to express or coated with a double stranded gene suppression agent or that may ingest plant material containing the gene suppression agent As used herein, a "pest resistance' trait is a characteristic of a transgenic plant, transgenic animal transgenic host or transgenic symbiont that causes the plant, animal host, or symbiont to be resistant to attack from a pest that typically is capable of inflicting damage or loss to the plant, animal, host or symbiont Such pest resistance can arise from a natural mutation or more typically from incorporation of recombinant DNA that confers pest resistance To impart insect resistance to a transgenic plant a recombinant DNA can, for example encode an insect lethal or insect inhibitory protein such as a delta endotoxin derived from a *B thuringiensis*

bacterium, e g as is used in commercially available varieties of cotton and corn, or be transcribed into a RNA molecule that forms a dsRNA molecule within the tissues or fluids of the recombinant plant The dsRNA molecule is comprised in part of a segment of RNA that is identical to a corresponding RNA segment encoded from a DNA sequence within an insect pest that prefers to feed on the recombinant plant Expression of the gene within the target insect pest is suppressed by the dsRNA, and the suppression of expression of the gene in the target insect pest results in the plant being insect resistant Fire et al (US Patent No 6,506,599) generically described inhibition of pest infestation, providing specifics only about several nucleotide sequences that were effective for inhibition of gene function in the nematode species *Caenorhabditis elegans* Similarly, Plaetinck et al (US 2003/0061626) describe the use of dsRNA for inhibiting gene function in a variety of nematode pests Mesa et al (US 2003/0150017) describe using dsDNA sequences to transform host cells to express corresponding dsRNA sequences that are substantially identical to target sequences in specific pathogens, and particularly describe constructing recombinant plants expressing such dsRNA sequences for ingestion by various plant pests, facilitating down-regulation of a gene in the genome of the pest and improving the resistance of the plant to the pest infestation

The present invention provides for inhibiting gene expression of one or multiple target genes in a target insect using stabilized dsRNA methods The invention is particularly useful in the modulation of eukaryotic gene expression in particular the modulation of expression of genes present in insects that exhibit a digestive system pH level that is from about 4 5 to about 9 5, more preferably from about 5 0 to about 8 0, and even more preferably from about 6 5 to about 7 5 Plant pests with a digestive system that exhibits pH levels outside of these ranges are not preferred candidates for double stranded RNA mediated methods for gene suppression using a delivery method that requires ingestion of the preferred dsRNA molecules The modulatory effect is applicable to a variety of genes expressed in the pests including for example endogenous genes responsible for cellular metabolism or cellular transformation including house keeping genes transcription factors and other genes which encode polypeptides involved in cellular metabolism

As used herein, the term "expression" refers to the transcription and stable accumulation of sense or antisense RNA derived from the nucleic acids disclosed in the present invention Expression may also refer to translation of mRNA into a polypeptide or protein As used herein, the term "sense" RNA refers to an RNA transcript corresponding to a sequence or segment that, when produced by the target pest, is in the form of a mRNA that is capable of being translated into protein by the target pest cell As used herein, the term "antisense RNA" refers to an RNA transcript that is complementary to all or a part of a mRNA that is normally produced in a cell of a target pest The complementarity of an antisense RNA may be with any part of the specific gene transcript, i e , at the 5' non-coding sequence, 3' non-translated sequence introns or the coding sequence As used herein the term "RNA transcript" refers to the product resulting from RNA polymerase-catalyzed transcription of a DNA sequence When the RNA transcript is a perfect complementary copy of the DNA sequence, it is referred to as the primary transcript or it may be an RNA sequence derived from post-transcriptional processing of the primary transcript and is referred to as the mature RNA

As used herein, the phrase inhibition of gene expression or "inhibiting expression of a target gene in the cell of an insect" refers to the absence (or observable decrease) in the level of protein and/or mRNA product from the target gene Specificity refers to the ability to inhibit the target gene without manifest effects on other genes of the cell and without any effects on any gene within the cell that is producing the dsRNA molecule The

inhibition of gene expression of the target gene in the insect pest may result in novel phenotypic traits in the insect pest

Without limiting the scope of the present invention, there is provided, in one aspect a method for controlling infestation of a target insect using the stabilized dsRNA strategies The method involves generating stabilized dsRNA molecules as one type of the insect control agents to induce gene silencing in an insect pest The insect control agents of the present invention induce directly or indirectly post-transcriptional gene silencing events of target genes in the insect Down-regulation of expression of the target gene prevents or at least retards the insect's growth, development, reproduction and infectivity to hosts As used herein the phrase 'generating stabilized dsRNA molecule" refers to the methods of employing recombinant DNA technologies readily available in the art (e g , by Sambrook, *et al* , In *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press*, Cold Spring Harbor, New York 1989) to construct a DNA nucleotide sequence that transcript the stabilized dsRNA The detailed construction methods of the present invention are disclosed below in this disclosure As used herein, the term "silencing" refers the effective "down-regulation" of expression of the targeted nucleotide sequence and, hence, the elimination of the ability of the sequence to cause an effect within the insect's cell

The present invention provides in part a delivery system for the delivery of the insect control agents to insects through their exposure to a diet containing the insect control agents of the present invention In accordance with one of the embodiments, the stabilized dsRNA or siRNA molecules may be incorporated in the insect diet or may be overlaid on the top of the diet for consumption by an insect

The present invention also provides in part a delivery system for the delivery of the insect control agents to insects through their exposure to an microorganism or a host such as a plant containing the insect control agents of the present invention by ingestion of the microorganism or the host cells or the contents of the cells In accordance with another one of the embodiments, the present invention involves generating a transgenic plant cell or a plant that contains a recombinant DNA construct transcribing the stabilized dsRNA molecules of the present invention As used herein, the phrase "generating a transgenic plant cell or a plant" refers to the methods of employing the recombinant DNA technologies readily available in the art (e g by Sambrook *et al*) to construct a plant transformation vector transcribing the stabilized dsRNA molecules of the present invention, to transform the plant cell or the plant and to generate the transgenic plant cell or the transgenic plant that contain the transcribed, stabilized dsRNA molecules In particular, the method of the present invention may comprise the recombinant construct in a cell of a plant that results in dsRNA transcripts that are substantially homologous to an RNA sequence encoded by a nucleotide sequence within the genome of an insect Where the nucleotide sequence within the genome of an insect encodes a gene essential to the viability and infectivity of the insect, its down-regulation results in a reduced capability of the insect to survive and infect host cells Hence, such down-regulation results in a "deleterious effect" on the maintenance viability and infectivity of the insect in that it prevents or reduces the insect's ability to feed off and survive on nutrients derived from the host cells By virtue of this reduction in the insect's viability and infectivity, resistance and/or enhanced tolerance to infection by an insect is facilitated in the cells of a plant Genes in the insect may be targeted at the mature (adult) immature (larval) or egg stages

In still another embodiment non-pathogenic, attenuated strains of microorganisms may be used as a carrier for the insect control agents and, in this perspective, the microorganisms carrying such agents are also

referred to as insect control agents The microorganisms may be engineered to express a nucleotide sequence of a target gene to produce RNA molecules comprising RNA sequences homologous or complementary to RNA sequences typically found within the cells of an insect Exposure of the insects to the microorganisms result in ingestion of the microorganisms and down-regulation of expression of target genes mediated directly or indirectly by the RNA molecules or fragments or derivatives thereof

The present invention alternatively provides exposure of an insect to the insect control agents of the present invention incorporated in a spray mixer and applied to the surface of a host, such as a host plant In an exemplary embodiment ingestion of the insect control agents by an insect delivers the insect control agents to the gut of the insect and subsequently to the cells within the body of the insect In another embodiment infection of the insect by the insect control agents through other means such as by injection or other physical methods also permits delivery of the insect control agents In yet another embodiment, the RNA molecules themselves are encapsulated in a synthetic matrix such as a polymer and applied to the surface of a host such as a plant Ingestion of the host cells by an insect permits delivery of the insect control agents to the insect and results in down-regulation of a target gene in the host

It is envisioned that the compositions of the present invention can be incorporated within the seeds of a plant species either as a product of expression from a recombinant gene incorporated into a genome of the plant cells or incorporated into a coating or seed treatment that is applied to the seed before planting The plant cell containing a recombinant gene is considered herein to be a transgenic event

It is believed that a pesticidal seed treatment can provide significant advantages when combined with a transgenic event that provides protection from invertebrate pest infestation that is within the preferred effectiveness range against a target pest In addition, it is believed that there are situations that are well known to those having skill in the art where it is advantageous to have such transgenic events within the preferred range of effectiveness

The present invention also includes seeds and plants having more that one transgenic event Such combinations are referred to as "stacked" transgenic events These stacked transgenic events can be events that are directed at the same target pest, or they can be directed at different target pests In one preferred method a seed having the ability to express a Cry 3 protein or insecticidal variant thereof also has the ability to express at least one other insecticidal agent including but not limited to a protein that is different from a Cry 3 protein and/or an RNA molecule the sequence of which is derived from the sequence of an RNA expressed in a target pest and that forms a double stranded RNA structure upon expressing in the seed or cells of a plant grown from the seed wherein the ingestion of one or more cells of the plant by the target pest results in the suppression of expression of the RNA in the cells of the target pest

In another preferred method, the seed having the ability to express a dsRNA the sequence of which is derived from a target pest also has a transgenic event that provides herbicide tolerance It is preferred that the transgenic event that provides herbicide tolerance is an event that provides resistance to glyphosate, N-(phosphonomethyl) glycine, including the isopropylamine salt form of such herbicide

In the present method, a seed comprising a transgenic event is treated with a pesticide

It is believed that the combination of a transgenic seed exhibiting bioactivity against a target pest as a result of the production of an insecticidal amount of an insecticidal dsRNA within the cells of the transgenic seed or plant grown from the seed coupled with treatment of the seed with certain chemical or protein pesticides provides

unexpected synergistic advantages to seeds having such treatment, including unexpectedly superior efficacy for protection against damage to the resulting transgenic plant by the target pest In particular it is believed that the treatment of a transgenic seed that is capable of expressing certain constructs that form dsRNA molecules, the sequence of which are derived from one or more sequences expressed in a corn rootworm, with from about 100 gm to about 400 gm of certain pesticides per 100 kg of seed provided unexpectedly superior protection against corn rootworm In addition, it is believed that such combinations are also effective to protect the emergent corn plants against damage by black cutworm The seeds of the present invention are also believed to have the property of decreasing the cost of pesticide use, because less of the pesticide can be used to obtain a required amount of protection than if the innovative composition and method is not used Moreover, because less pesticide is used and because it is applied prior to planting and without a separate field application it is believed that the subject method is therefore safer to the operator and to the environment and is potentially less expensive than conventional methods

When it is said that some effects are "synergistic", it is meant to include the synergistic effects of the combination on the pesticidal activity (or efficacy) of the combination of the transgenic event and the pesticide However, it is not intended that such synergistic effects be limited to the pesticidal activity, but that they should also include such unexpected advantages as increased scope of activity, advantageous activity profile as related to type and amount of damage reduction, decreased cost of pesticide and application, decreased pesticide distribution in the environment, decreased pesticide exposure of personnel who produce, handle and plant corn seeds, and other advantages known to those skilled in the art

Pesticides ans insecticides that are useful in compositions in combination with the methods and compositions of the present invention, including as seed treatments and coatings as well as methods for using such compositions can be found, for example, in US Patent No 6,551,962, the entirety of which is incorporated herein by reference

It has been found that the present invention is useful to protect seeds and plants against a wide array of agricultural pests, including insects mites, fungi, yeasts, molds bacteria, nematodes, weeds and parasitic and saprophytic plants

It is preferred that the seed treatments and coatings described herein be used along with transgenic seeds of the present invention in particular by application of a pesticidal agent other than the dsRNA molecules derived from the sequences described herein as set forth in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 and SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing or the complements thereof to a transgenic seed Although it is believed that the seed treatments can be applied to a transgenic seed in any physiological state it is preferred that the seed be in a sufficiently durable state that it incurs no damage during the treatment process Typically, the seed would be a seed that had been harvested from the field, removed from the transgenic plant, and separated from any other non-seed plant material The seed would preferably also be biologically stable to the extent that the treatment would cause no biological damage to the seed In one embodiment, for example, the treatment can be applied to seed corn that has been harvested, cleaned and dried to a moisture content below about 15% by weight In an alternative embodiment, the seed can be one that has been dried and then primed with water and/or another material and then re-dried before or during the treatment with the pesticide Within the limitations just described, it is believed that the treatment can be applied to the seed at any time between harvest of the seed and sowing of the seed As used herein, the term "unsown seed" is

meant to include seed at any period between the harvest of the seed and the sowing of the seed in the ground for the purpose of germination and growth of the plant

When it is said that unsown seed is "treated" with the pesticide, such treatment is not meant to include those practices in which the pesticide is applied to the soil, rather than to the seed For example, such treatments as the application of the pesticide in bands, "T"-bands, or in-furrow at the same time as the seed is sowed are not considered to be included in the present invention

The pesticide, or combination of pesticides, can be applied "neat", that is without any diluting or additional components present However, the pesticide is typically applied to the seeds in the form of a pesticide formulation This formulation may contain one or more other desirable components including but not limited to liquid diluents, binders to serve as a matrix for the pesticide, fillers for protecting the seeds during stress conditions and plasticizers to improve flexibility, adhesion and/or spreadability of the coating In addition for oily pesticide formulations containing little or no filler it may be desirable to add to the formulation drying agents such as calcium carbonate kaolin or bentonite clay, perlite, diatomaceous earth or any other adsorbent material Use of such components in seed treatments is known in the art See, *e g*, U S Patent No 5,876,739 The skilled artisan can readily select desirable components to use in the pesticide formulation depending on the seed type to be treated and the particular pesticide that is selected In addition, readily available commercial formulations of known pesticides may be used, as demonstrated in the examples below

The subject pesticides can be applied to a seed as a component of a seed coating Seed coating methods and compositions that are known in the art are useful when they are modified by the addition of one of the embodiments of the combination of pesticides of the present invention Such coating methods and apparatus for their application are disclosed in, for example, U S Patent Nos 5,918,413, 5,891,246, 5,554,445, 5,389,399, 5,107,787, 5,080,925, 4,759,945 and 4,465,017 Seed coating compositions are disclosed, for example in U S Patent Nos 5,939 356 5 882 713, 5,876,739, 5,849,320 5,834,447, 5,791,084, 5,661 103, 5,622,003, 5 580,544, 5,328 942 5 300,127, 4 735 015, 4 634 587, 4,383,391 4 372 080, 4,339 456 4,272 417 and 4 245,432, among others

The pesticides that are useful in the coating are those pesticides that are described herein The amount of pesticide that is used for the treatment of the seed will vary depending upon the type of seed and the type of active ingredients but the treatment will comprise contacting the seeds with an amount of the combination of pesticides that is pesticidally effective When insects are the target pest, that amount will be an amount of the insecticide that is insecticidally effective As used herein, an insecticidally effective amount means that amount of insecticide that will kill insect pests in the larvae or pupal state of growth, or will consistently reduce or retard the amount of damage produced by insect pests

In general, the amount of pesticide that is applied to the seed in the treatment will range from about 10 gm to about 2000 gm of the active ingredient of the pesticide per 100 kg of the weight of the seed Preferably, the amount of pesticide will be within the range of about 50 gm to about 1000 gm active per 100 kg of seed, more preferably within the range of about 100 gm to about 600 gm active per 100 kg of seed, and even more preferably within the range of about 200 gm to about 500 gm of active per 100 kg of seed weight Alternatively, it has been found to be preferred that the amount of the pesticide be over about 60 gm of the active ingredient of the pesticide per 100 kg of the seed, and more preferably over about 80 gm per 100 kg of seed

The pesticides that are used in the treatment must not inhibit germination of the seed and should be efficacious in protecting the seed and/or the plant during that time in the target insect's life cycle in which it causes injury to the seed or plant In general the coating will be efficacious for approximately 0 to 120 days after sowing

The pesticides of the subject invention can be applied to the seed in the form of a coating The use of a coating is particularly effective in accommodating high pesticidal loads, as can be required to treat typically refractory pests, such as corn rootworm while at the same time preventing unacceptable phytotoxicity due to the increased pesticidal load

The coatings formed with a pesticide composition contemplated herein are preferably capable of effecting a slow rate of release of the pesticide by diffusion or movement through the matrix to the surrounding medium

In addition to the coating layer, the seed may be treated with one or more of the following ingredients other pesticides including fungicides and herbicides, herbicidal safeners, fertilizers and/or biocontrol agents These ingredients may be added as a separate layer or alternatively may be added in the pesticidal coating layer

The pesticide formulation may be applied to the seeds using conventional coating techniques and machines, such as fluidized bed techniques, the roller mill method, rotostatic seed treaters, and drum coaters Other methods, such as spouted beds may also be useful The seeds may be presized before coating After coating, the seeds are typically dried and then transferred to a sizing machine for sizing Such procedures are known in the art

As used herein the term 'insect control agent", or ' gene suppression agent ' refers to a particular RNA molecule consisting of a first RNA segment and a second RNA segment linked by a third RNA segment The first and the second RNA segments lie within the length of the RNA molecule and are substantially inverted repeats of each other and are linked together by the third RNA segment The complementarity between the first and the second RNA segments results in the ability of the two segments to hybridize in vivo and in vitro to form a double stranded molecule, i e , a stem, linked together at one end of each of the first and second segments by the third segment which forms a loop so that the entire structure forms into a stem and loop structure, or even more tightly hybridizing structures may form into a stem-loop knotted structure The first and the second segments correspond invariably and not respectively to a sense and an antisense sequence with respect to the target RNA transcribed from the target gene in the target insect pest that is suppressed by the ingestion of the dsRNA molecule The insect control agent can also be a substantially purified (or isolated) nucleic acid molecule and more specifically nucleic acid molecules or nucleic acid fragment molecules thereof from a genomic DNA (gDNA) or cDNA library Alternatively, the fragments may comprise smaller oligonucleotides having from about 15 to about 250 nucleotide residues, and more preferably about 15 to about 30 nucleotide residues The ' insect control agent' may also refer to a DNA construct that comprises the isolated and purified nucleic acid molecules or nucleic acid fragment molecules thereof from a gDNA or cDNA library The 'insect control agent' may further refer to a microorganism comprising such a DNA construct that comprises the isolated and purified nucleic acid molecules or nucleic acid fragment molecules thereof from a gDNA or cDNA library As used herein, the phrase 'generating an insect control agent" refers to the methods of employing the recombinant DNA technologies readily available in the art (e g , by Sambrook, *et al*) to prepare a recombinant DNA construct transcribing the stabilized dsRNA or siRNA molecules, to construct a vector transcribing the

stabilized dsRNA or siRNA molecules, and/or to transform and generate the cells or the microorganisms that contain the transcribed, stabilized dsRNA or siRNA molecules The method of the present invention provides for the production of a dsRNA transcript the nucleotide sequence of which is substantially homologous to a targeted RNA sequence encoded by a target nucleotide sequence within the genome of a target insect pest

As used herein, the term "genome" as it applies to cells of an insect or a host encompasses not only chromosomal DNA found within the nucleus, but organelle DNA found within subcellular components of the cell The DNA's of the present invention introduced into plant cells can therefore be either chromosomally integrated or organelle-localized The term "genome' as it applies to bacteria encompasses both the chromosome and plasmids within a bacterial host cell The DNA s of the present invention introduced into bacterial host cells can therefore be either chromosomally integrated or plasmid-localized

Inhibition of target gene expression may be quantified by measuring either the endogenous target RNA or the protein produced by translation of the target RNA and the consequences of inhibition can be confirmed by examination of the outward properties of the cell or organism Techniques for quantifying RNA and proteins are well known to one of ordinary skill in the art Multiple selectable markers are available that confer resistance to ampicillin, bleomycin, chloramphenicol, gentamycin, hygromycin, kanamycin, lincomycin methotrexate, phosphinothricin, puromycin, spectinomycin, rifampicin, and tetracyclin, and the like

In certain preferred embodiments gene expression is inhibited by at least 10%, preferably by at least 33% more preferably by at least 50%, and yet more preferably by at least 80% In particularly preferred embodiments of the invention gene expression is inhibited by at least 80%, more preferably by at least 90%, more preferably by at least 95%, or by at least 99% within cells in the insect so a significant inhibition takes place Significant inhibition is intended to refer to sufficient inhibition that results in a detectable phenotype (e g , cessation of larval growth, paralysis or mortality etc) or a detectable decrease in RNA and/or protein corresponding to the target gene being inhibited Although in certain embodiments of the invention inhibition occurs in substantially all cells of the insect, in other preferred embodiments inhibition occurs in only a subset of cells expressing the gene For example, if the gene to be inhibited plays an essential role in cells in the insect alimentary tract inhibition of the gene within these cells is sufficient to exert a deleterious effect on the insect

The advantages of the present invention may include, but are not limited to, the following the ease of introducing dsRNA into the insect cells, the low concentration of dsRNA or siRNA which can be used, the stability of dsRNA or siRNA, and the effectiveness of the inhibition The ability to use a low concentration of a stabilized dsRNA avoids several disadvantages of anti-sense interference The present invention is not limited to *in vitro* use or to specific sequence compositions, to a particular set of target genes, a particular portion of the target gene's nucleotide sequence or a particular transgene or to a particular delivery method, as opposed to the some of the available techniques known in the art, such as antisense and co-suppression Furthermore, genetic manipulation becomes possible in organisms that are not classical genetic models

In practicing the present invention, it is important that the presence of the nucleotide sequences that are transcribed from the recombinant construct are neither harmful to cells of the plant in which they are expressed in accordance with the invention, nor harmful to an animal food chain and in particular humans Because the produce of the plant may be made available for human ingestion the down-regulation of expression of the target nucleotide sequence occurs only in the insect

Therefore in order to achieve inhibition of a target gene selectively within an insect species that it is desired to control the target gene should preferably exhibit a low degree of sequence identity with corresponding genes in a plant or a vertebrate animal Preferably the degree of the sequence identity is less than approximately 80% More preferably the degree of the sequence identity is less than approximately 70% Most preferably the degree of the sequence identity is less than approximately 60%

According to one embodiment of the present invention, there is provided a nucleotide sequence for which *in vitro* expression results in transcription of a stabilized RNA sequence that is substantially homologous to an RNA molecule of a targeted gene in an insect that comprises an RNA sequence encoded by a nucleotide sequence within the genome of the insect Thus, after the insect ingests the stabilized RNA sequence incorporated in a diet or sprayed on a plant surface, a down-regulation of the nucleotide sequence corresponding to the target gene in the cells of a target insect is affected The down-regulated nucleotide sequence in the insect results in a deleterious effect on the maintenance, viability, proliferation, reproduction and infectivity of the insect Therefore the nucleotide sequence of the present invention may be useful in modulating or controlling infestation by a range of insects

According to another embodiment of the present invention there is provided a nucleotide sequence, the expression of which in a microbial cell results in a transcription of an RNA sequence which is substantially homologous to an RNA molecule of a targeted gene in an insect that comprises an RNA sequence encoded by a nucleotide sequence within the genome of the insect Thus, after the insect ingests the stabilized RNA sequence contained in the cell of the microorganism, it will affect down-regulation of the nucleotide sequence of the target gene in the cells of the insect The down-regulated nucleotide sequence in the insect results in a deleterious effect on the maintenance viability proliferation, reproduction and infestation of the insect Therefore the nucleotide sequence of the present invention may be useful in modulating or controlling infestation by a range of insects

According to yet another embodiment of the present invention there is provided a nucleotide sequence, the expression of which in a plant cell results in a transcription of an RNA sequence which is substantially homologous to an RNA molecule of a targeted gene in an insect that comprises an RNA sequence encoded by a nucleotide sequence within the genome of the insect Thus, after the insect ingests the stabilized RNA sequence contained in the cell of the plant, it will affect down-regulation of the nucleotide sequence of the target gene in the cells of the insect The down-regulated nucleotide sequence in the insect results in a deleterious effect on the maintenance, viability, proliferation, reproduction and infestation of the insect Therefore, the nucleotide sequence of the present invention may be useful in modulating or controlling infestation by a range of insects in plants

As used herein, the term "substantially homologous" or "substantial homology', with reference to a nucleic acid sequence refers to a nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to the coding sequence as set forth in any of SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in any of SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing, or the complements thereof Sequences that hybridize under stringent conditions to any of SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or any of SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing or the complements thereof, are those that allow an antiparallel alignment to take place between the two sequences, and the two sequences are then able, under stringent conditions, to form hydrogen bonds with corresponding bases on the opposite strand to form a duplex

molecule that is sufficiently stable under the stringent conditions to be detectable using methods well known in the art Such substantially homologous sequences have preferably from about 65% to about 70% sequence identity, or more preferably from about 80% to about 85% sequence identity, or most preferable from about 90% to about 95% sequence identity to about 99% sequence identity, to the referent nucleotide sequences as set forth in any of SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in any of SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing or the complements thereof

As used herein, the term sequence identity', sequence similarity" or "homology" is used to describe sequence relationships between two or more nucleotide sequences The percentage of 'sequence identity" between two sequences is determined by comparing two optimally aligned sequences over a comparison window, wherein the portion of the sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (i e gaps) as compared to the reference sequence (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences The percentage is calculated by determining the number of positions at which the identical nucleic acid base or amino acid residue occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the window of comparison, and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity A sequence that is identical at every position in comparison to a reference sequence is said to be identical to the reference sequence and vice-versa A first nucleotide sequence when observed in the 5' to 3' direction is said to be a "complement' of, or complementary to, a second or reference nucleotide sequence observed in the 3' to 5' direction if the first nucleotide sequence exhibits complete complementarity with the second or reference sequence As used herein nucleic acid sequence molecules are said to exhibit "complete complementarity' when every nucleotide of one of the sequences read 5' to 3 is complementary to every nucleotide of the other sequence when read 3 to 5' A nucleotide sequence that is complementary to a reference nucleotide sequence will exhibit a sequence identical to the reverse complement sequence of the reference nucleotide sequence These terms and descriptions are well defined in the art and are easily understood by those of ordinary skill in the art

As used herein a "comparison window" refers to a conceptual segment of at least 6 contiguous positions, usually about 50 to about 100, more usually about 100 to about 150, in which a sequence is compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned The comparison window may comprise additions or deletions (i e gaps) of about 20% or less as compared to the reference sequence (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences Those skilled in the art should refer to the detailed methods used for sequence alignment in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7 0 Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison Wis USA) or refer to Ausubel et al (1998) for a detailed discussion of sequence analysis

The target gene of the present invention is derived from an insect cell or alternatively a foreign gene such as a foreign genetic sequence from a virus, a fungus, an insect or a nematode among others By 'derived" it is intended that a sequence is all or a part of the naturally occurring nucleotide sequence of the target gene from the genome of an insect cell, particularly all or a part of the naturally occurring nucleotide sequence of the capped, spliced and polyadenylated mRNA expressed from the naturally occurring DNA sequence as found in the cell if the gene is a structural gene, or the sequence of all or a part of an RNA that is other than a structural gene including but not limited to a tRNA, a catalytic RNA, a ribosomal RNA, a micro-RNA, and the like A sequence is derived from one of these naturally occurring RNA sequences if the derived sequence is produced

based on the nucleotide sequence of the native RNA, exhibits from about 80% to about 100% sequence identity to the native sequence, and hybridizes to the native sequence under stringent hybridization conditions In one embodiment, the target gene comprises a nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in any of SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing or the complements thereof Depending on the particular target gene and the dose of dsRNA molecules delivered, this process may provide partial or complete loss of function for the target gene, or any desired level of suppression in between

The present invention also provides an artificial DNA sequence capable of being expressed in a cell or microorganism and which is capable of inhibiting target gene expression in a cell tissue or organ of an insect, wherein the artificial DNA sequence at least comprises a dsDNA molecule coding for one or more different nucleotide sequences, wherein each of the different nucleotide sequences comprises a sense nucleotide sequence and an antisense nucleotide sequence connected by a spacer sequence coding for a dsRNA molecule of the present invention The spacer sequence constitutes part of the sense nucleotide sequence or the antisense nucleotide sequence and will form within the dsRNA molecule between the sense and antisense sequences The sense nucleotide sequence or the antisense nucleotide sequence is substantially identical to the nucleotide sequence of the target gene or a derivative thereof or a complementary sequence thereto The dsDNA molecule is placed operably under the control of a promoter sequence that functions in the cell, tissue or organ of the host expressing the dsDNA to produce dsRNA molecules In one embodiment, the artificial DNA sequence may be derived from a nucleotide sequence as set forth in , in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing

The invention also provides an artificial DNA sequence for expression in a cell of a plant and that, upon expression of the DNA to RNA and ingestion by a target pest achieves suppression of a target gene in a cell tissue or organ of an insect pest The dsRNA at least comprises one or multiple structural gene sequences, wherein each of the structural gene sequences comprises a sense nucleotide sequence and an antisense nucleotide sequence connected by a spacer sequence that forms a loop within the complementary and antisense sequences The sense nucleotide sequence or the antisense nucleotide sequence is substantially identical to the nucleotide sequence of the target gene, derivative thereof, or sequence complementary thereto The one or more structural gene sequences is placed operably under the control of one or more promoter sequences, at least one of which is operable in the cell, tissue or organ of a prokaryotic or eukaryotic organism, particularly an insect In one embodiment, the artificial DNA sequence comprises from about , from about SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or from about SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing or the complements thereof

As used herein, the term non naturally occurring gene , ' non-naturally occurring coding sequences" artificial sequence", or "synthetic coding sequences' for transcribing the dsRNA or siRNA of the present invention or fragments thereof refers to those prepared in a manner involving any sort of genetic isolation or manipulation that results in the preparation of a coding sequence that transcribes a dsRNA or a siRNA of the present invention or fragments thereof This includes isolation of the coding sequence from its naturally occurring state, manipulation of the coding sequence as by (1) nucleotide insertion, deletion, or substitution, (2) segment insertion deletion or substitution, (3) chemical synthesis such as phosphoramidite chemistry and the like, site-specific mutagenesis truncation of the coding sequence or any other manipulative or isolative method

The non-naturally occurring gene sequence or fragment thereof according to this aspect of the invention for WCR control may be cloned between two tissue specific promoters, such as two root specific promoters which are operable in a transgenic plant cell and therein expressed to produce mRNA in the transgenic plant cell that form dsRNA molecules thereto The dsRNA molecules contained in plant tissues are ingested by an insect so that the intended suppression of the target gene expression is achieved

The present invention also provides a method for obtaining a nucleic acid comprising a nucleotide sequence for producing a dsRNA or siRNA of the present invention In a preferred embodiment the method of the present invention for obtaining the nucleic acid comprising (a) probing a cDNA or gDNA library with a hybridization probe comprising all or a portion of a nucleotide sequence or a homolog thereof from a targeted insect, (b) identifying a DNA clone that hybridizes with the hybridization probe (c) isolating the DNA clone identified in step (b) and (d) sequencing the cDNA or gDNA fragment that comprises the clone isolated in step (c) wherein the sequenced nucleic acid molecule transcribes all or a substantial portion of the RNA nucleotide acid sequence or a homolog thereof

In another preferred embodiment, the method of the present invention for obtaining a nucleic acid fragment comprising a nucleotide sequence for producing a substantial portion of a dsRNA or siRNA of the present invention comprising (a) synthesizing a first and a second oligonucleotide primers corresponding to a portion of one of the nucleotide sequences from a targeted insect, and (b) amplifying a cDNA or gDNA insert present inta cloning vector using the first and second oligonucleotide primers of step (a) wherein the amplified nucleic acid molecule transcribes a substantial portion of the a substantial portion of a dsRNA or siRNA of the present invention

In practicing the present invention, a target gene may be derived from a corn rootworm (CRW), such as a WCR or a SCR, or any insect species that cause damages to the crop plants and subsequent yield losses The present inventors contemplate that several criteria may be employed in the selection of preferred target genes The gene is one whose protein product has a rapid turnover rate, so that dsRNA inhibition will result in a rapid decrease in protein levels In certain embodiments it is advantageous to select a gene for which a small drop in expression level results in deleterious effects for the insect If it is desired to target a broad range of insect species a gene is selected that is highly conserved across these species Conversely, for the purpose of conferring specificity, in certain embodiments of the invention, a gene is selected that contains regions that are poorly conserved between individual insect species or between insects and other organisms In certain embodiments it may be desirable to select a gene that has no known homologs in other organisms

As used herein, the term "derived from' refers to a specified nucleotide sequence that may be obtained *from a particular specified source or species albeit not necessarily directly from that specified source or species*

In one embodiment, a gene is selected that is expressed in the insect gut Targeting genes expressed in the gut avoids the requirement for the dsRNA to spread within the insect Target genes for use in the present invention may include for example, those that share substantial homologies to the nucleotide sequences of known gut-expressed genes that encode protein components of the plasma membrane proton V-ATPase (Dow et al , 1997 J Exp Biol , 200 237-245, Dow, Bioenerg Biomemb , 1999, 31 75-83) This protein complex is the sole energizer of epithelial ion transport and is responsible for alkalinization of the midgut lumen The V-ATPase is also expressed in the Malpighian tubule, an outgrowth of the insect hindgut that functions in fluid balance and detoxification of foreign compounds in a manner analogous to a kidney organ of a mammal

In another embodiment a gene is selected that is essentially involved in the growth, development, and reproduction of an insect Exemplary genes include but are not limited to a CHD3 gene and a ß-tubulin gene The CHD3 gene in *Drosophila melanogaster* encodes a protein with ATP-dependent DNA helicase activity that is involved in chromatin assembly/disassembly in the nucleus Similar sequences have been found in diverse organisms such as *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* and *Saccharomyces cerevisiae* The beta-tubulin gene family encodes microtubule-associated proteins that are a constituent of the cellular cytoskeleton Related sequences are found in such diverse organisms as *Caenorhabditis elegans*, and *Manduca Sexta*

Other target genes for use in the present invention may include, for example, those that play important roles in the viability, growth, development, reproduction and infectivity These target genes may be one of the house keeping genes, transcription factors and insect specific genes or lethal knockout mutations in *Drosophila* The target genes for use in the present invention may also be those that are from other organisms, e g , from a nematode (e g *C elegans*) Additionally, the nucleotide sequences for use in the present invention may also be derived from plant, viral bacterial or fungal genes whose functions have been established from literature and the nucleotide sequences of which share substantial similarity with the target genes in the genome of an insect According to one aspect of the present invention for WCR control the target sequences may essentially be derived from the targeted WCR insect Some of the exemplary target sequences from cDNA library from WCR that encode *D v virgifera* proteins or fragments thereof which are homologues of known proteins may be found in the Sequnece Listing

Nucleic acid molecules from *D virgifera* encoding homologs of known proteins are known (Andersen et al , US Patent Application Serial No 10/205,189)

Although the sequences described in Andersen et al are primarily in reference to WCR it is preferred in the practice of the invention to use DNA segments whose sequences exhibit at least from about 80% identity, or at least from 90% identity, or at least from 95% identity, or at least from 98% identity, or at least about 100% identity to sequences corresponding to genes or coding sequences within the pest for which control is desired Sequences less than about 80% identical to a target gene are less effective Inhibition is specific to the pests' gene or genes, the sequence of which corresponds to the dsRNA Expression of unrelated genes is not affected This specificity allows the selective targeting of pest species, resulting in no effect on other organisms exposed to the compositions of the present invention

A DNA segment for use in the present invention is at least from about 19 to about 23 or about 23 to about 100 nucleotides but less than about 2000 nucleotides, in length

The invention is not limited to the specific genes described herein but encompasses any gene the inhibition of which exerts a deleterious effect on an insect pest

For many of the insects that are potential targets for control by the present invention, there may be limited information regarding the sequences of most genes or the phenotype resulting from mutation of particular genes Therefore, the present inventors contemplate that selection of appropriate genes from insect pests for use in the present invention may be accomplished through use of information available from study of the corresponding genes in a model organism such in *Drosophila*, in some other insect species, or even in a nematode species in a fungal species in a plant species, in which the genes have been characterized In some cases it will be possible to obtain the sequence of a corresponding gene from a target insect by searching databases such as GenBank using either the name of the gene or the sequence from for example, *Drosophila*,

another insect, a nematode, a fungus or a plant from which the gene has been cloned Once the sequence is obtained, PCR may be used to amplify an appropriately selected segment of the gene in the insect for use in the present invention

In order to obtain a DNA segment from the corresponding gene in an insect species, PCR primers are designed based on the sequence as found in WCR or other insects from which the gene has been cloned The primers are designed to amplify a DNA segment of sufficient length for use in the present invention DNA (either genomic DNA or cDNA) is prepared from the insect species, and the PCR primers are used to amplify the DNA segment Amplification conditions are selected so that amplification will occur even if the primers do not exactly match the target sequence Alternately, the gene (or a portion thereof) may be cloned from a gDNA or cDNA library prepared from the insect pest species, using the WCR gene or another known insect gene as a probe Techniques for performing PCR and cloning from libraries are known Further details of the process by which DNA segments from target insect pest species may be isolated based on the sequence of genes previously cloned from WCR or other insect species are provided in the Examples One of ordinary skill in the art will recognize that a variety of techniques may be used to isolate gene segments from insect pest species that correspond to genes previously isolated from other species

Insects that may cause damage in plants generally belong to three categories based upon their methods of feeding and these three categories are, respectively, chewing, sucking and boring insects that belong to the Orders *Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Heteroptera, Ctenophalides, Arachnidiae,* and *Hymenoptera* The chewing insects that eat plant tissue such as roots, leaves, flowers, buds and twigs, cause major damage Examples from this large insect category include beetles and their larvae WCR and SCR belong to the chewing insects Their larvae feed on roots of a plant in particular a corn plant, and adults mainly on the foliage Genes derived from the WCR or SCR or from any one species of the above listed orders may be considered as targets for performing the present invention

It has been found that the present method is useful to protect seeds and plants against a wide array of agricultural pests, including insects mites fungi, yeasts, molds, bacteria nematodes, weeds, and parasitic and saprophytic plants, and the like

When an insect is the target pest for the present invention, such pests include but are not limited to from the order Lepidoptera, for example

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, Keiferia lycopersicella Leucoptera scitella Lithocolletis* 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* and *Yponomeuta* spp

from the order Coleoptera for example,

Agriotes spp., *Anthonomus* spp *Atomaria linearis Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites* spp., *Curculio* spp., *Dermestes* spp., *Diabrotica* spp., *Epilachna* spp., *Eremnus* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptrus* spp., *Melolontha* spp., *Orycaephilus* spp., *Otiorhynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes* spp., *Rhizopertha* spp., *Scarabeidae*, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp *Tenebrio* spp., *Tribolium* spp and *Trogoderma* spp

from the order Orthoptera, for example

Blatta spp *Blattella* spp., *Gryllotalpa* spp., *Leucophaea maderae*, *Locusta* spp *Periplaneta* ssp., and *Schistocerca* spp

from the order Isoptera, for example,

Reticulitermes ssp,

from the order Psocoptera for example,

Liposcelis spp.,

from the order Anoplura, for example,

Haematopinus spp., *Linognathus* spp *Pediculus* spp *Pemphigus* spp and *Phylloxera* spp

from the order Mallophaga for example,

Damalinea spp and *Trichodectes* spp.,

from the order *Thysanoptera*, for example,

Franklinella spp., *Hercinothrips* spp., *Taeniothrips* spp., *Thrips palmi*, *Thrips tabaci and Scirtothrips aurantii*,

from the order Heteroptera, for example

Cimex spp., *Distantiella theobroma Dysdercus* spp., *Euchistus* spp., *Eurygaster* spp *Leptocorisa* spp., *Nezara* spp., *Piesma* spp *Rhodnius* spp *Sahlbergella singularis*, *Scotinophara* spp., *Triatoma* spp., *Miridae* family spp such as *Lygus hesperus* and *Lygus lineolaris*, *Lygaeidae* family spp such as *Blissus leucopterus*, and *Pentatomidae* family spp.,

from the order Homoptera, for example,

Aleurothrixus floccosus, *Aleyrodes brassicae*, *Aonidiella* spp., *Aphididae*, *Aphis* spp., *Aspidiotus* spp *Bemisia tabaci Ceroplastes* spp *Chrysomphalus aonidum Chrysomphalus dictyospermi*, *Coccus hesperidum*, *Empoasca* spp., *Eriosoma lanigerum*, *Erythroneura* spp *Gascardia* spp., *Laodelphax* spp *Lecanium corni Lepidosaphes* spp., *Macrosiphus* spp., *Myzus* spp *Nehotettix* spp., *Nilaparvata* spp., *Paratoria* spp *Pemphigus* spp., *Planococcus* spp., *Pseudaulacaspis* spp *Pseudococcus* spp *Psylla* ssp., *Pulvinaria aethiopica Quadraspidiotus* spp *Rhopalosiphum* spp., *Saissetia* spp *Scaphoideus* spp., *Schizaphis* spp *Sitobion* spp., *Trialeurodes vaporariorum*, *Trioza erytreae* and *Unaspis citri*

from the order Hymenoptera, for example,

Acromyrmex, *Atta* spp., *Cephus* spp., *Diprion* spp., *Diprionidae*, *Gilpinia polytoma Hoplocampa* spp., *Lasius* sppp., *Monomorium pharaonis*, *Neodiprion* spp *Solenopsis* spp and *Vespa* ssp

from the order Diptera for example,

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., *Liriomysa* spp., *Lucilia* spp., *Melanagromyza* spp.,

Musca ssp , *Oestrus* spp , *Orseolia* spp , *Oscinella frit, Pegomyia hyoscyami, Phorbia* spp , *Rhagoletis pomonella, Sciara* spp , *Stomoxys* spp *Tabanus* spp , *Tannia* spp and *Tipula* spp ,

from the order Siphonaptera for example,

Ceratophyllus spp und *Xenopsylla cheopis* and

from the order *Thysanura*, for example,

Lepisma saccharina

It has been found that the present invention is particularly effective when the insect pest is a *Diabrotica spp*, and especially when the pest is *Diabrotica virgifera virgifera* (Western Corn Rootworm, WCR) *Diabrotica barberi* (Northern Corn Rootworm, NCR), *Diabrotica virgifera zeae* (Mexican Corn Rootworm, MCR), *Diabrotica balteata* (Brazilian Corn Rootworm (BZR) or Brazilian Corn Rootworm complex (BCR) consisting of *Diabrotica viridula* and *Diabrotica speciosa*), or *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Southern Corn Rootworm SCR)

The present invention is also particularly effective for controlling species of insects that pierce and/or suck the fluids from the cells and tissues of plants, including but not limited to stinkbugs (*Pentatomidae* family species) and plant bugs in the *Miridae* family such as western tarnished plant bugs (*Lygus hesperus* species) tarnished plant bugs (*Lygus lineolaris* species), and pale legume bugs (*Lygus elisus*)

Modifications of the methods disclosed herein are also surprisingly particularly useful in controlling crop pests within the order lepidopteran

The present invention provides stabilized dsRNA or siRNA molecules for control of insect infestations The dsRNA or siRNA nucleotide sequences comprise double strands of polymerized ribonucleotide and may include modifications to either the phosphate-sugar backbone or the nucleoside Modifications in RNA structure may be tailored to allow specific genetic inhibition

In one embodiment, the dsRNA molecules may be modified through an enzymatic process so the siRNA molecules may be generated The siRNA can efficiently mediate the down-regulation effect for some target genes in some insects This enzymatic process may be accomplished by utilizing an RNAse III enzyme or a DICER enzyme, present in the cells of an insect, a vertebrate animal a fungus or a plant in the eukaryotic RNAi pathway (Elbashir et al 2002, Methods 26(2) 199-213 Hamilton and Baulcombe, 1999, Science 286 950–952) This process may also utilize a recombinant DICER or RNAse III introduced into the cells of a target insect through recombinant DNA techniques that are readily known to the skilled in the art Both the DICER enzyme and RNAse III being naturally occurring in an insect or being made through recombinant DNA techniques, cleave larger dsRNA strands into smaller oligonucleotides The DICER enzymes specifically cut the dsRNA molecules into siRNA pieces each of which is about 19-25 nucleotides in length while the RNAse III enzymes normally cleave the dsRNA molecules into 12-15 base-pair siRNA The siRNA molecules produced by the either of the enzymes have 2 to 3 nucleotide 3' overhangs, and 5' phosphate and 3' hydroxyl termini The siRNA molecules generated by RNAse III enzyme are the same as those produced by Dicer enzymes in the eukaryotic RNAi pathway and are hence then targeted and degraded by an inherent cellular RNA-degrading mechanism after they are subsequently unwound separated into single-stranded RNA and hybridize with the RNA sequences transcribed by the target gene This process results in the effective degradation or removal of the RNA sequence encoded by the nucleotide sequence of the target gene in the

insect The outcome is the silencing of a particularly targeted nucleotide sequence within the insect Detailed descriptions of enzymatic processes can be found in Hannon (2002 Nature, 418 244-251)

Inhibition of a target gene using the stabilized dsRNA technology of the present invention is sequence-specific in that nucleotide sequences corresponding to the duplex region of the RNA are targeted for genetic inhibition RNA containing a nucleotide sequences identical to a portion of the target gene is preferred for inhibition RNA sequences with insertions, deletions, and single point mutations relative to the target sequence have also been found to be effective for inhibition In performance of the present invention, it is preferred that the inhibitory dsRNA and the portion of the target gene share at least from about 80% sequence identity, or from about 90% sequence identity, or from about 95% sequence identity or from about 99% sequence identity, or even about 100% sequence identity Alternatively, the duplex region of the RNA may be defined functionally as a nucleotide sequence that is capable of hybridizing with a portion of the target gene transcript A less than full length sequence exhibiting a greater homology compensates for a longer less homologous sequence The length of the identical nucleotide sequences may be at least about 25 50, 100, 200, 300, 400, 500 or at least about 1000 bases Normally, a sequence of greater than 20-100 nucleotides should be used, though a sequence of greater than about 200-300 nucleotides would be preferred, and a sequence of greater than about 500-1000 nucleotides would be especially preferred depending on the size of the target gene The invention has the advantage of being able to tolerate sequence variations that might be expected due to genetic mutation, strain polymorphism, or evolutionary divergence The introduced nucleic acid molecule may not need to be absolute homology, may not need to be full length, relative to either the primary transcription product or fully processed mRNA of the target gene Therefore, those skilled in the art need to realize that, as disclosed herein 100% sequence identity between the RNA and the target gene is not required to practice the present invention

The dsRNA molecules may be synthesized either *in vivo* or *in vitro* The dsRNA may be formed by a single self-complementary RNA strand or from two complementary RNA strands Endogenous RNA polymerase of the cell may mediate transcription *in vivo* or cloned RNA polymerase can be used for transcription *in vivo* or *in vitro* Inhibition may be targeted by specific transcription in an organ, tissue, or cell type, stimulation of an environmental condition (e g infection, stress temperature chemical inducers) and/or engineering transcription at a developmental stage or age The RNA strands may or may not be polyadenylated the RNA strands may or may not be capable of being translated into a polypeptide by a cell's translational apparatus

The RNA dsRNA, siRNA, or miRNA of the present invention may be produced chemically or enzymatically by one skilled in the art through manual or automated reactions or *in vivo* in another organism RNA may also be produced by partial or total organic synthesis, any modified ribonucleotide can be introduced by *in vitro* enzymatic or organic synthesis The RNA may be synthesized by a cellular RNA polymerase or a bacteriophage RNA polymerase (e g , T3, T7 SP6) The use and production of an expression construct are known in the art (see for example, WO 97/32016, U S Pat No's 5,593, 874, 5,698,425, 5,712,135, 5 789,214, and 5 804,693) If synthesized chemically or by *in vitro* enzymatic synthesis, the RNA may be purified prior to introduction into the cell For example RNA can be purified from a mixture by extraction with a solvent or resin precipitation, electrophoresis, chromatography, or a combination thereof Alternatively, the RNA may be used with no or a minimum of purification to avoid losses due to sample processing The RNA may be dried for

storage or dissolved in an aqueous solution The solution may contain buffers or salts to promote annealing, and/or stabilization of the duplex strands

For transcription from a transgene *in vivo* or an expression construct, a regulatory region (e g , promoter, enhancer, silencer, and polyadenylation) may be used to transcribe the RNA strand (or strands) Therefore, in one embodiment, the nucleotide sequences for use in producing RNA molecules may be operably linked to one or more promoter sequences functional in a microorganism a fungus or a plant host cell Ideally, the nucleotide sequences are placed under the control of an endogenous promoter, normally resident in the host genome The nucleotide sequence of the present invention, under the control of an operably linked promoter sequence may further be flanked by additional sequences that advantageously affect its transcription and/or the stability of a resulting transcript Such sequences are generally located upstream of the operably linked promoter and/or downstream of the 3' end of the expression construct and may occur both upstream of the promoter and downstream of the 3' end of the expression construct, although such an upstream sequence only is also contemplated

In another embodiment, the nucleotide sequence of the present invention may comprise an inverted repeat separated by a "spacer sequence" The spacer sequence may be a region comprising any sequence of nucleotides that facilitates secondary structure formation between each repeat, where this is required In one embodiment of the present invention, the spacer sequence is part of the sense or antisense coding sequence for mRNA The spacer sequence may alternatively comprise any combination of nucleotides or homologues thereof that are capable of being linked covalently to a nucleic acid molecule The spacer sequence may comprise a sequence of nucleotides of at least about 10-100 nucleotides in length, or alternatively at least about 100-200 nucleotides in length, at least 200-400 about nucleotides in length, or at least about 400-500 nucleotides in length

For the purpose of the present invention, the dsRNA or siRNA molecules may be obtained from the CRW by polymerase chain (PCR) amplification of a target CRW gene sequences derived from a corn rootworm gDNA or cDNA library or portions thereof The WCR larvae may be prepared using methods known to the ordinary skilled in the art and DNA/RNA may be extracted Larvae with various sizes ranging from 1st instars to fully-grown CRWs may be used for the purpose of the present invention for DNA/RNA extraction Genomic DNA or cDNA libraries generated from WCR may be used for PCR amplification for production of the dsRNA or siRNA

The target genes may be then be PCR amplified and sequenced using the methods readily available in the art One skilled in the art may be able to modify the PCR conditions to ensure optimal PCR product formation The confirmed PCR product may be used as a template for *in vitro* transcription to generate sense and antisense RNA with the included minimal promoters

The present inventors contemplate that nucleic acid sequences identified and isolated from any insect species in the insect kingdom may be used in the present invention for control of WCR and another targeted insects In one aspect of the present invention the nucleic acid may be derived from a species from a coleopteran species Specifically, the nucleic acid may be derived from leaf beetles belonging to the genus *Diabrotica* (Coleoptera Chrysomelidae) and more specifically the nucleic acid molecules of the present invention may be derived from species in the *virgifera* group Most specifically, the nucleic acid molecules of the present invention may be derived from *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte that is normally referred to as

WCR The isolated nucleic acids may be useful, for example in identifying a target gene and in constructing a recombinant vector that produce stabilized dsRNAs or siRNAs of the present invention for protecting plants from WCR insect infestations

Therefore, in one embodiment, the present invention comprises isolated and purified nucleotide sequences from WCR or Lygus that may be used as the insect control agents The isolated and purified nucleotide sequences comprise those as set forth in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing

The nucleic acids from WCR or other insects that may be used in the present invention may also comprise isolated and substantially purified Unigenes and EST nucleic acid molecules or nucleic acid fragment molecules thereof EST nucleic acid molecules may encode significant portions of or indeed most of, the polypeptides Alternatively, the fragments may comprise smaller oligonucleotides having from about 15 to about 250 nucleotide residues, and more preferably, about 15 to about 30 nucleotide residues Alternatively the nucleic acid molecules for use in the present invention may be from cDNA libraries from WCR, from Lygus or from any other invertebrate pest species

As used herein the phrase "a substantially purified nucleic acid", "an artificial sequence', "an isolated and substantially purified nucleic acid", or "an isolated and substantially purified nucleotide sequence" refers to a nucleic acid that is no longer accompanied by some of materials with which it is associated in its natural state or to a nucleic acid the structure of which is not identical to that of any of naturally occurring nucleic acid Examples of a substantially purified nucleic acid include (1) DNAs which have the sequence of part of a naturally occurring genomic DNA molecules but are not flanked by two coding sequences that flank that part of the molecule in the genome of the organism in which it naturally occurs, (2) a nucleic acid incorporated into a vector or into the genomic DNA of a prokaryote or eukaryote in a manner such that the resulting molecule is not identical to any naturally occurring vector or genomic DNA, (3) a separate molecule such as a cDNA, a genomic fragment, a fragment produced by polymerase chain reaction (PCR), or a restriction fragment, (4) recombinant DNAs and (5) synthetic DNAs A substantially purified nucleic acid may also be comprised of one or more segments of cDNA genomic DNA or synthetic DNA

Nucleic acid molecules and fragments thereof from WCR Lygus or other invertebrate pest species may be employed to obtain other nucleic acid molecules from other species for use in the present invention to produce desired dsRNA and siRNA molecules Such nucleic acid molecules include the nucleic acid molecules that encode the complete coding sequence of a protein and promoters and flanking sequences of such molecules In addition such nucleic acid molecules include nucleic acid molecules that encode for gene family members Such molecules can be readily obtained by using the above-described nucleic acid molecules or fragments thereof to screen cDNA or gDNA libraries obtained from *D v virgifera* or from *Lygus hesperus* Methods for forming such libraries are well known in the art

Nucleic acid molecules and fragments thereof from WCR or Lygus may also be employed to obtain other nucleic acid molecules such as nucleic acid homologues for use in the present invention to produce desired dsRNA and siRNA molecules Such homologues include the nucleic acid molecules that encode, in whole or in part protein homologues of other species, plants or other organisms Such molecules can be readily obtained by using the above-described nucleic acid molecules or fragments thereof to screen EST, cDNA or gDNA libraries Methods for forming such libraries are well known in the art Such homologue molecules may differ in their

nucleotide sequences from those found in one or more of , in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listingor complements thereof disclosed herein because complete complementarity is not needed for stable hybridization These nucleic acid molecules also include molecules that, although capable of specifically hybridizing with the nucleic acid molecules may lack complete complementarity In a particular embodiment, methods for 3' or 5' RACE may be used to obtain such sequences (Frohman, M A *et al Proc Natl Acad Sci (U S A) 85* 8998-9002 (1988) Ohara, O *et al*, *Proc Natl Acad Sci (U S A) 86* 5673-5677 (1989)) In general, any of the above described nucleic acid molecules or fragments may be used to generate dsRNAs or siRNAs that are suitable for use in a diet in a spray-on mixer or in a recombinant DNA construct of the present invention

As used herein the phrase "coding sequence", "structural nucleotide sequence" or "structural nucleic acid molecule' refers to a nucleotide sequence that is translated into a polypeptide, usually via mRNA when placed under the control of appropriate regulatory sequences The boundaries of the coding sequence are determined by a translation start codon at the 5'-terminus and a translation stop codon at the 3'-terminus A coding sequence can include, but is not limited to, genomic DNA, cDNA, EST and recombinant nucleotide sequences

The term " recombinant DNA" or "recombinant nucleotide sequence" refers to DNA that contains a genetically engineered modification through manipulation via mutagenesis, restriction enzymes, and the like

The nucleic acid molecules or fragment of the nucleic acid molecules or other nucleic acid molecules from WCR are capable of specifically hybridizing to other nucleic acid molecules under certain circumstances As used herein two nucleic acid molecules are said to be capable of specifically hybridizing to one another if the two molecules are capable of forming an anti-parallel, double-stranded nucleic acid structure A nucleic acid molecule is said to be the complement of another nucleic acid molecule if they exhibit complete complementarity Two molecules are said to be 'minimally complementary" if they can hybridize to one another with sufficient stability to permit them to remain annealed to one another under at least conventional "low-stringency" conditions Similarly the molecules are said to be complementary if they can hybridize to one another with sufficient stability to permit them to remain annealed to one another under conventional "high-stringency" conditions Conventional stringency conditions are described by Sambrook *et al*, and by Haymes, *et al* In *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press Washington, DC (1985)

Departures from complete complementarity are therefore permissible, as long as such departures do not completely preclude the capacity of the molecules to form a double-stranded structure Thus in order for a nucleic acid molecule or a fragment of the nucleic acid molecule to serve as a primer or probe it needs only be sufficiently complementary in sequence to be able to form a stable double-stranded structure under the particular solvent and salt concentrations employed

Appropriate stringency conditions which promote DNA hybridization are, for example, 6 0 x sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by a wash of 2 0 x SSC at 50°C, are known to those skilled in the art or can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N Y (1989), 6 3 1-6 3 6 For example, the salt concentration in the wash step can be selected from a low stringency of about 2 0 x SSC at 50°C to a high stringency of about 0 2 x SSC at 50°C In addition, the temperature in the wash step can be increased from low stringency conditions at room temperature, about 22°C, to high stringency conditions

Comentario [LML1]: Incorporated by reference? or did you already?

at about 65°C Both temperature and salt may be varied or either the temperature or the salt concentration may be held constant while the other variable is changed

A nucleic acid for use in the present invention may specifically hybridize to one or more of nucleic acid molecules from WCR or complements thereof under moderately stringent conditions for example at about 2 0 x SSC and about 65°C A nucleic acid for use in the present invention will include those nucleic acid molecules that specifically hybridize to one or more of the nucleic acid molecules disclosed therein as set forth in , in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing or complements thereof under high stringency conditions Preferably, a nucleic acid for use in the present invention will exhibit at least from about 80%, or at least from about 90%, or at least from about 95% or at least from about 98% or even about 100% sequence identity with one or more nucleic acid molecules as set forth in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing or as disclosed herein, or a nucleic acid for use in the present invention will exhibit at from about 80% or at least from about 90%, or at least from about 95%, or at least from about 98% or even about 100% sequence identity with one or more nucleic acid molecules as set forth in , in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing isolated from the genomic DNA of an insect pest

All or a substantial portion of the nucleic acids from WCR may be used to isolate cDNAs, gDNAs and nucleic acids encoding *Diabrotica* protein homologues or fragments thereof from the same or other species The detailed descriptions of the techniques on isolation and identification of nucleic acids of the present invention from cDNA or gDNA libraries are disclosed in the examples

Nucleic acids of the present invention may also be synthesized either completely or in part, especially where it is desirable to provide plant-preferred sequences, by methods known in the art Thus, all or a portion of the nucleic acids of the present invention may be synthesized using codons preferred by a selected host Species-preferred codons may be determined, for example, from the codons used most frequently in the proteins expressed in a particular host species Other modifications of the nucleotide sequences may result in mutants having slightly altered activity

The present invention provides in part a delivery system for the delivery of insect control agents to insects The stabilized dsRNA or siRNA molecules of the present invention may be directly introduced into the cells of an insect or introduced into an extracellular cavity, interstitial space lymph system, digestive system, into the circulation of the insect through oral ingestion or other means that one skilled in the art may employ Methods for oral introduction may include direct mixing of RNA with food of the insect, as well as engineered approaches in which a species that is used as food is engineered to express the dsRNA or siRNA, then fed to the insect to be affected In one embodiment for example the dsRNA or siRNA molecules may be incorporated into, or overlaid on the top of, the insect s diet In another embodiment the RNA may be sprayed onto a plant surface In still another embodiment, the dsRNA or siRNA may be expressed by microorganisms and the microorganisms may be applied onto a plant surface or introduced into a root, stem by a physical means such as an injection In still another embodiment a plant may be genetically engineered to express the dsRNA or siRNA in an amount sufficient to kill the insects known to infect the plant

Specifically, in practicing the present invention in WCR, the stabilized dsRNA or siRNA may be introduced in the midgut inside the insect and achieve the desired inhibition of the targeted genes The dsRNA

or siRNA molecules may be incorporated into a diet or be overlaid on the diet as discussed above and may be ingested by the insects In any event, the dsRNA's of the present invention are provided in the diet of the target pest The target pest of the present invention will exhibit a digestive tract pH from about 4 5 to about 9 5 or from about 5 to about 8 5, or from about 6 to about 8, or from about 6 5 to about 7 7 or about 7 0 The digestive tract of a target pest is defined herein as the location within the pest that food that is ingested by the target pest is exposed to an environment that is favorable for the uptake of the dsRNA molecules of the present invention without suffering a pH so extreme that the hydrogen bonding between the double-strands of the dsRNA are caused to dissociate and form single stranded molecules

Further for the purpose of controlling insect infestations in plants, delivery of insect control dsRNAs to the surfaces of a plant via a spray-on application affords another means of protecting the plants In this instance, a bacterium engineered to produce and accumulate dsRNAs may be fermented and the products of the fermentation formulated as a spray-on product compatible with common agricultural practices The formulations may include the appropriate stickers and wetters required for efficient foliar coverage as well as UV protectants to protect dsRNAs from UV damage Such additives are commonly used in the biomsecticide industry and are well known to those skilled in the art Likewise, formulations for soil application may include granular formulations that serve as a bait for larvae of soil insect pests such as the corn rootworm

It is also anticipated that dsRNA s produced by chemical or enzymatic synthesis may be formulated in a manner consistent with common agricultural practices and used as spray-on products for controlling insect infestations The formulations may include the appropriate stickers and wetters required for efficient foliar coverage as well as UV protectants to protect dsRNAs from UV damage Such additives are commonly used in the biomsecticide industry and are well known to those skilled in the art Such applications could be combined with other spray-on insecticide applications, biologically based or not, to enhance plant protection from insect feeding damage

The present inventors contemplate that bacterial strains producing insecticidal proteins may be used to produce dsRNAs for insect control purposes These strains may exhibit improved insect control properties A variety of different bacterial hosts may be used to produce insect control dsRNAs Exemplary bacteria may include *E coli*, *B thuringiensis*, *Pseudomonas* sp *Photorhabdus* sp , *Xenorhabdus* sp , *Serratia entomophila* and related *Serratia* sp , *B sphaericus B cereus B laterosporus*, *B popilliae Clostridium bifermentans* and other *Clostridium* species or other spore-forming gram-positive bacteria

The present invention also relates to recombinant DNA constructs for expression in a microorganism Exogenous nucleic acids from which an RNA of interest is transcribed can be introduced into a microbial host cell, such as a bacterial cell or a fungal cell, using methods known in the art

The nucleotide sequences of the present invention may be introduced into a wide variety of prokaryotic and eukaryotic microorganism hosts to produce the stabilized dsRNA or siRNA molecules The term "microorganism" includes prokaryotic and eukaryotic microbial species such as bacteria and fungi Fungi include yeasts and filamentous fungi, among others Illustrative prokaryotes, both Gram-negative and Gram-positive, include *Enterobacteriaceae*, such as *Escherichia*, *Erwinia Shigella*, *Salmonella*, and *Proteus*, *Bacillaceae Rhizobiceae*, such as *Rhizobium Spirillaceae* such as photobacterium, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*, *Lactobacillaceae Pseudomonadaceae*, such as *Pseudomonas* and *Acetobacter*, *Azotobacteraceae*, *Actinomycetales*, and *Nitrobacteraceae* Among eukaryotes are fungi, such as

Phycomycetes and *Ascomycetes*, which includes yeast, such as *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*, and *Basidiomycetes* yeast, such as *Rhodotorula, Aureobasidium Sporobolomyces*, and the like

For the purpose of plant protection against insects a large number of microorganisms known to inhabit the phylloplane (the surface of the plant leaves) and/or the rhizosphere (the soil surrounding plant roots) of a wide variety of important crops may also be desirable host cells for manipulation, propagation, storage, delivery and/or mutagenesis of the disclosed recombinant constructs These microorganisms include bacteria, algae, and fungi Of particular interest are microorganisms, such as bacteria, *e g*, genera *Bacillus* (including the species and subspecies *B thuringiensis kurstaki* HD-1, *B thuringiensis kurstaki* HD-73 *B thuringiensis sotto B thuringiensis berliner B thuringiensis thuringiensis B thuringiensis tolworthi B thuringiensis dendrolimus, B thuringiensis alesti, B thuringiensis galleriae, B thuringiensis aizawai, B thuringiensis subtoxicus B thuringiensis entomocidus, B thuringiensis tenebrionis* and *B thuringiensis san diego*), *Pseudomonas, Erwinia, Serratia, Klebsiella, Zanthomonas Streptomyces, Rhizobium, Rhodopseudomonas, Methylophilius, Agrobacterium, Acetobacter, Lactobacillus, Arthrobacter Azotobacter, Leuconostoc* and *Alcaligenes* fungi particularly yeast, *e g*, genera *Saccharomyces, Cryptococcus, Kluyveromyces, Sporobolomyces Rhodotorula* and *Aureobasidium* Of particular interest are such phytosphere bacterial species as *Pseudomonas syringae Pseudomonas fluorescens, Serratia marcescens, Acetobacter xylinum Agrobacterium tumefaciens Rhodobacter sphaeroides, Xanthomonas campestris, Rhizobium melioti, Alcaligenes eutrophus* and *Azotobacter vinlandii*, and phytosphere yeast species such as *Rhodotorula rubra, R glutinis R marina R aurantiaca Cryptococcus albidus C diffluens, C laurentii, Saccharomyces rosei, S pretoriensis S cerevisiae, Sporobolomyces roseus S odorus, Kluyveromyces veronae*, and *Aureobasidium pollulans*

A bacterial recombinant DNA vector may be a linear or a closed circular plasmid The vector system may be a single vector or plasmid or two or more vectors or plasmids that together contain the total DNA to be introduced into the genome of the bacterial host In addition, the bacterial vector may be an expression vector Nucleic acid molecules as set forth in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing or fragments thereof can, for example, be suitably inserted into a vector under the control of a suitable promoter that functions in one or more microbial hosts to drive expression of a linked coding sequence or other DNA sequence Many vectors are available for this purpose, and selection of the appropriate vector will depend mainly on the size of the nucleic acid to be inserted into the vector and the particular host cell to be transformed with the vector Each vector contains various components depending on its function (amplification of DNA or expression of DNA) and the particular host cell with which it is compatible The vector components for bacterial transformation generally include, but are not limited to, one or more of the following a signal sequence, an origin of replication, one or more selectable marker genes and an inducible promoter allowing the expression of exogenous DNA

Expression and cloning vectors generally contain a selection gene also referred to as a selectable marker This gene encodes a protein necessary for the survival or growth of transformed host cells grown in a selective culture medium Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins e g , ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, e g , the gene encoding D-alanine racemase

for *Bacilli* Those cells that are successfully transformed with a heterologous protein or fragment thereof produce a protein conferring drug resistance and thus survive the selection regimen

An expression vector for producing a mRNA can also contains an inducible promoter that is recognized by the host bacterial organism and is operably linked to the nucleic acid encoding for example, the nucleic acid molecule coding the *D v virgifera* mRNA or fragment thereof of interest Inducible promoters suitable for use with bacterial hosts include β-lactamase promoter, *E coli* λ phage P_L and P_R promoters, and *E coli* galactose promoter, arabinose promoter alkaline phosphatase promoter tryptophan (trp) promoter, and the lactose operon promoter and variations thereof and hybrid promoters such as the *tac* promoter However, other known bacterial inducible promoters are suitable

The term 'operably linked", as used in reference to a regulatory sequence and a structural nucleotide sequence means that the regulatory sequence causes regulated expression of the linked structural nucleotide sequence "Regulatory sequences" or "control elements' refer to nucleotide sequences located upstream (5' noncoding sequences), within, or downstream (3' non-translated sequences) of a structural nucleotide sequence, and which influence the timing and level or amount of transcription, RNA processing or stability, or translation of the associated structural nucleotide sequence Regulatory sequences may include promoters, translation leader sequences introns, enhancers stem-loop structures repressor binding sequences, and polyadenylation recognition sequences and the like

Alternatively, the expression constructs can be integrated into the bacterial genome with an integrating vector Integrating vectors typically contain at least one sequence homologous to the bacterial chromosome that allows the vector to integrate Integrations appear to result from recombinations between homologous DNA in the vector and the bacterial chromosome For example integrating vectors constructed with DNA from various *Bacillus* strains integrate into the *Bacillus* chromosome (EP 0 127,328) Integrating vectors may also be comprised of bacteriophage or transposon sequences Suicide vectors are also known in the art

Construction of suitable vectors containing one or more of the above-listed components employs standard recombinant DNA techniques Isolated plasmids or DNA fragments are cleaved, tailored, and re-ligated in the form desired to generate the plasmids required Examples of available bacterial expression vectors include, but are not limited to, the multifunctional *E coli* cloning and expression vectors such as Bluescript™ (Stratagene La Jolla, CA), in which for example, a *D v virgifera* protein or fragment thereof, may be ligated into the vector in frame with sequences for the amino-terminal Met and the subsequent 7 residues of β-galactosidase so that a hybrid protein is produced, pIN vectors (Van Heeke and Schuster 1989, *J Biol Chem 264* 5503-5509), and the like

A yeast recombinant construct can typically include one or more of the following a promoter sequence fusion partner sequence, leader sequence, transcription termination sequence, a selectable marker These elements can be combined into an expression cassette, which may be maintained in a replicon, such as an extrachromosomal element (e g plasmids) capable of stable maintenance in a host, such as yeast or bacteria The replicon may have two replication systems, thus allowing it to be maintained, for example, in yeast for expression and in a prokaryotic host for cloning and amplification Examples of such yeast-bacteria shuttle vectors include YEp24 (Botstein et al , 1979, Gene, 8 17-24), pCl/1 (Brake et al , 1984, Proc Natl Acad Sci USA, 81 4642-4646), and YRp17 (Stinchcomb et al , 1982, J Mol Biol , 158 157) In addition, a replicon may be either a high or low copy number plasmid A high copy number plasmid will generally have a copy number

ranging from about 5 to about 200, and typically about 10 to about 150 A host containing a high copy number plasmid will preferably have at least about 10, and more preferably at least about 20

Useful yeast promoter sequences can be derived from genes encoding enzymes in the metabolic pathway Examples of such genes include alcohol dehydrogenase (ADH) (EP 0 284044), enolase, glucokinase glucose-6-phosphate isomerase, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAP or GAPDH), hexokinase, phosphofructokinase, 3-phosphoglycerate mutase, and pyruvate kinase (PyK) (EP 0 3215447) The yeast PHO5 gene encoding acid phosphatase, also provides useful promoter sequences (Myanohara et al Proc Natl Acad Sci USA 80 1, 1983) In addition synthetic promoters that do not occur in nature also function as yeast promoters Examples of such hybrid promoters include the ADH regulatory sequence linked to the GAP transcription activation region (US Patent No 4,876,197 and 4,880 734) Other examples of hybrid promoters include promoters which consist of the regulatory sequences of the ADH2, GAL4, GAL10, or PHO5 genes, combined with the transcriptional activation region of a glycolytic enzyme gene such as GAP or PyK (EP 0 164556) Furthermore, a yeast promoter can include naturally occurring promoters of non-yeast origin that have the ability to bind yeast RNA polymerase and initiate transcription

Examples of transcription terminator sequences and other yeast-recognized termination sequences, such as those coding for glycolytic enzymes, are known to those of skill in the art

Alternatively the expression constructs can be integrated into the yeast genome with an integrating vector Integrating vectors typically contain at least one sequence homologous to a yeast chromosome that allows the vector to integrate, and preferably contain two homologous sequences flanking the expression construct Integrations appear to result from recombinations between homologous DNA in the vector and the yeast chromosome (Orr-Weaver et al , 1983 Methods in Enzymol , 101 228-245) An integrating vector may be directed to a specific locus in yeast by selecting the appropriate homologous sequence for inclusion in the vector See Orr-Weaver et al , supra One or more expression constructs may integrate, possibly affecting levels of recombinant protein produced (Rine et al , 1983 Proc Natl Acad Sci USA 80 6750) The chromosomal sequences included in the vector can occur either as a single segment in the vector, which results in the integration of the entire vector, or as two segments homologous to adjacent segments in the chromosome and flanking the expression construct in the vector, which results in the stable integration of only the expression construct

The present invention also contemplates transformation of a nucleotide sequence of the present invention into a plant to achieve pest inhibitory levels of expression of one or more dsRNA molecules A transformation vector can be readily prepared using methods available in the art The transformation vector comprises one or more nucleotide sequences that is/are capable of being transcribed to an RNA molecule and that is/are substantially homologous and/or complementary to one or more nucleotide sequences encoded by the genome of the insect, such that upon uptake of the RNA transcribed from the one or more nucleotide sequences molecules by the insect, there is down-regulation of expression of at least one of the respective nucleotide sequences of the genome of the insect

The transformation vector may further mean a dsDNA construct and may also be regarded inter alia as a recombinant molecule, an insect control agent, a genetic molecule or a chimeric genetic construct A chimeric genetic construct of the present invention may comprise for example, nucleotide sequences encoding one or more antisense transcripts, one or more sense transcripts one or more of each of the afore-mentioned, wherein

all or part of a transcript therefrom is homologous to all or part of an RNA molecule comprising an RNA sequence encoded by a nucleotide sequence within the genome of an insect

In one embodiment the plant transformation vector is an isolated and purified DNA molecule comprising a promoter operatively linked to one or more nucleotide sequences of the present invention The nucleotide sequence is selected from the group consisting of , SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 and SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing The nucleotide sequence includes a segment coding all or part of an RNA present within a targeted pest RNA transcript and may comprise inverted repeats of all or a part of a targeted pest RNA The DNA molecule comprising the expression vector may also contain a functional intron sequence positioned either upstream of the coding sequence or even within the coding sequence, and may also contain a five prime (5) untranslated leader sequence (i e , a UTR or 5'-UTR) positioned between the promoter and the point of translation initiation

A plant transformation vector may contain sequences from more than one gene thus allowing production of more than one dsRNA for inhibiting expression of two or more genes in cells of a target pest One skilled in the art will readily appreciate that segments of DNA whose sequence corresponds to that present in different genes can be combined into a single composite DNA segment for expression in a transgenic plant Alternatively a plasmid of the present invention already containing at least one DNA segment can be modified by the sequential insertion of additional DNA segments between the enhancer and promoter and terminator sequences In the insect control agent of the present invention designed for the inhibition of multiple genes, the genes to be inhibited can be obtained from the same insect species in order to enhance the effectiveness of the insect control agent In certain embodiments, the genes can be derived from different insects in order to broaden the range of insects against which the agent is effective When multiple genes are targeted for suppression or a combination of expression and suppression, a polycistronic DNA element can be fabricated as illustrated and disclosed in Fillatti, Application Publication No. US 2004-0029283

Where a nucleotide sequence of the present invention is to be used to transform a plant a promoter exhibiting the ability to drive expression of the coding sequence in that particular species of plant is selected Promoters that function in different plant species are also well known in the art Promoters useful for expression of polypeptides in plants are those that are inducible, viral, synthetic, or constitutive as described in Odell *et al* (1985, Nature 313 810-812) and/or promoters that are temporally regulated spatially regulated, and spatio-temporally regulated Preferred promoters include the enhanced CaMV35S promoters, and the FMV35S promoter For the purpose of the present invention, e g , for optimum control of species that feed on roots it is preferable to achieve the highest levels of expression of these genes within the roots of plants A number of root-enhanced promoters have been identified and are known in the art (Lu et al 2000, J Plant Phys 156(2) 277-283,US Patent No 5,837,848 and 6,489,542) A recombinant DNA vector or construct of the present invention will typically comprise a selectable marker that confers a selectable phenotype on plant cells Selectable markers may also be used to select for plants or plant cells that contain the exogenous nucleic acids encoding polypeptides or proteins of the present invention The marker may encode biocide resistance, antibiotic resistance (e g kanamycin, G418 bleomycin, hygromycin, etc), or herbicide resistance (e g , glyphosate etc) Examples of selectable markers include, but are not limited to a *neo* gene which codes for kanamycin resistance and can be selected for using kanamycin, G418, etc , a bar gene which codes for bialaphos resistance a mutant EPSP synthase gene which encodes glyphosate resistance, a nitrilase gene which confers

resistance to bromoxynil a mutant acetolactate synthase gene (ALS) which confers imidazolinone or sulphonylurea resistance, and a methotrexate resistant DHFR gene

A recombinant vector or construct of the present invention may also include a screenable marker Screenable markers may be used to monitor expression Exemplary screenable markers include a β-glucuronidase or *uid*A gene (GUS) which encodes an enzyme for which various chromogenic substrates are known (Jefferson 1987, *Plant Mol Biol, Rep 5* 387-405, Jefferson *et al* 1987, *EMBO J 6* 3901-3907), an R-locus gene, which encodes a product that regulates the production of anthocyanin pigments (red color) in plant tissues (Dellaporta *et al* 1988, Stadler Symposium *11* 263-282), a β-lactamase gene (Sutcliffe *et al* 1978, *Proc Natl Acad Sci 75* 3737-3741), a gene which encodes an enzyme for which various chromogenic substrates are known (e g , PADAC, a chromogenic cephalosporin), a luciferase gene (Ow *et al* , 1986 *Science 234* 856-859) a *xyl*E gene (Zukowsky *et al* , 1983, *Proc Natl Acad Sci 80* 1101-1105) which encodes a catechol dioxygenase that can convert chromogenic catechols an α-amylase gene (Ikatu *et al* 1990 *Biotechnol 8* 241-242) a tyrosinase gene (Katz *et al* , 1983, *J Gen Microbiol 129* 2703-2714) which encodes an enzyme capable of oxidizing tyrosine to DOPA and dopaquinone which in turn condenses to melanin an α -galactosidase, which catalyzes a chromogenic α-galactose substrate

In general it is preferred to introduce a functional recombinant DNA at a non-specific location in a plant genome In special cases it may be useful to insert a recombinant DNA construct by site-specific integration Several site-specific recombination systems exist which are known to function implants include cre-lox as disclosed in U S Patent 4,959 317 and FLP-FRT as disclosed in U S Patent 5 527,695

In practice DNA is introduced into only a small percentage of target cells in any single transformation experiment Genes encoding selectable markers are used to provide an efficient system for identification of those cells that are stably transformed by receiving and integrating a transgenic DNA construct into their genomes Preferred marker genes provide selective markers that confer resistance to a selective agent, such as an antibiotic or herbicide Any of the herbicides to which plants of this invention may be resistant are useful agents for selective markers Potentially transformed cells are exposed to the selective agent In the population of surviving cells will be those cells where, generally, the resistance-conferring gene is integrated and expressed at sufficient levels to permit cell survival Cells may be tested further to confirm stable integration of the exogenous DNA Commonly used selective marker genes include those conferring resistance to antibiotics such as kanamycin (*nptII*), hygromycin B (*aph IV*) and gentamycin (*aac3* and *aac*C4) or resistance/tolerance to herbicides such as glufosinate (*bar* or *pat*), glyphosate (EPSPS), and AMPA (*phn*O) Examples of such selectable markers are illustrated in U S Patents 5,550,318, 5,633,435, 5,780,708 and 6,118 047 Screenable markers which provide an ability to visually identify transformants can also be employed, *e g* a gene expressing a colored or fluorescent protein such as a luciferase or green fluorescent protein (GFP) or a gene expressing a *beta*-glucuronidase or *uid*A gene (GUS) for which various chromogenic substrates are known

Preferred plant transformation vectors include those derived from a Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* (e g U S Pat Nos 4,536 475, 4 693,977, 4,886,937, 5, 501,967 and EP 0 122 791) *Agrobacterium rhizogenes* plasmids (or "Ri") are also useful and known in the art Other preferred plant transformation vectors include those disclosed, *e g* , by Herrera-Estrella (1983, Nature 303 209-213), Bevan (1983, Nature 304 184-187), Klee (1985, Bio/Technol 3 637-642) and EP 0 120 516

Methods and compositions for transforming plants by introducing a recombinant DNA construct into a plant genome includes any of a number of methods known in the art One method for constructing transformed plants is microprojectile bombardment as illustrated in U S Patents 5,015,580 5,550 318 5.538 880 6 153 812 6,160,208, 6,288,312 and 6 399 861 Another method for constructing transformed plants is *Agrobacterium*-mediated transformation as illustrated in U S Patents 5,159 135, 5,824,877, 5 591,616 and 6,384 301 Alternatively, other non-*Agrobacterium* species can be used, such as for example *Rhizobium* and other prokaryotic cells that exhibit the capacity for plant cell infection and introduction of heterologous nucleotide sequences into the genome(s) of the infected plant cell

The DNA constructs of the present invention may be introduced into the genome of a desired plant host by a variety of conventional transformation techniques, which are well known to those skilled in the art Suitable plant transformation vectors for the purpose of *Agrobacterium* mediated transformation include those derived from a Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* In addition to *Agrobacterium* mediated plant transformation vectors alternative methods can be used to insert the DNA constructs of the present invention into plant cells Such methods may involve, but are not limited to, for example, the use of liposomes electroporation chemicals that increase free DNA uptake, free DNA delivery via microprojectile bombardment, and transformation using viruses or pollen

Any of the isolated nucleic acid molecules of the present invention may be introduced into a plant cell in a permanent or transient manner in combination with other genetic elements such as promoters, introns, enhancers, and untranslated leader sequences, etc Any of the nucleic acid molecules encoding a coleopteran species RNA or an RNA from a piercing and sucking insect species or preferably a *D v virgifera* RNA or a *Lygus hesperus* RNA, may be fabricated and introduced into a plant cell in a manner that allows for production of the dsRNA molecules within the plant cell providing an insecticidal amount of one or more particular dsRNA's in the diet of a target insect pest

The term transgenic plant cell' or "transgenic plant" refers to a plant cell or a plant that contains an exogenous nucleic acid, which can be derived from WCR, or from a different insect species or any other non-insect species The transgenic plants are also meant to comprise progeny (decedent, offspring, *etc*) of any generation of such a transgenic plant or a seed of any generation of all such transgenic plants wherein said progeny or seed comprises a DNA sequence encoding the RNA, sRNA, dsRNA siRNA, or fragment thereof of the present invention is also an important aspect of the invention

A transgenic plant formed using *Agrobacterium* transformation methods typically contains a single simple recombinant DNA sequence inserted into one chromosome and is referred to as a transgenic event Such transgenic plants can be referred to as being heterozygous for the inserted exogenous sequence A transgenic plant homozygous with respect to a transgene can be obtained by sexually mating (selfing) an independent segregant transgenic plant that contains a single exogenous gene sequence to itself, for example an F0 plant, to produce F1 seed One fourth of the F1 seed produced will be heterozygous with respect to the transgene Germinating F1 seed results in plants that can be tested for heterozygosity, typically using a SNP assay or a thermal amplification assay that allows for the distinction between heterozygotes and homozygotes (i e , a zygosity assay) Crossing a heterozygous plant with itself or another heterozygous plant results in only heterozygous progeny

In addition to direct transformation of a plant with a recombinant DNA construct, transgenic plants can be prepared by crossing a first plant having a recombinant DNA construct with a second plant lacking the construct For example, recombinant DNA for gene suppression can be introduced into first plant line that is amenable to transformation to produce a transgenic plant that can be crossed with a second plant line to introgress the recombinant DNA for gene suppression into the second plant line

Transgenic plants, that can be generated by practice of the present invention, include but are not limited to alfalfa aneth, apple, apricot, artichoke, arugula, asparagus, avocado banana barley beans beet blackberry blueberry, broccoli brussel sprouts, cabbage, canola, cantaloupe carrot, cassava, cauliflower, celery, cherry, cilantro, citrus, clementine, coffee, corn cotton, cucumber, Douglas fir eggplant endive, escarole, eucalyptus, fennel, figs, gourd grape grapefruit honey dew, jicama kiwifruit lettuce, leeks, lemon, lime, Loblolly pine mango, melon, mushroom, nut oat okra, onion, orange an ornamental plant, papaya, parsley pea, peach, peanut pear, pepper, persimmon, pine, pineapple plantain plum, pomegranate, poplar, potato, pumpkin, quince, radiata pine, radicchio, radish raspberry, rice, rye sorghum, Southern pine soybean, spinach squash strawberry, sugarbeet, sugarcane, sunflower, sweet potato, sweetgum, tangerine, tea, tobacco, tomato, turf, a vine watermelon wheat, yams and zucchini

The present invention can be, in practice, combined with other insect control traits in a plant to achieve desired traits for enhanced control of insect infestation Combining insect control traits that employ distinct modes-of-action can provide insect-protected transgenic plants with superior durability over plants harboring a single insect control trait because of the reduced probability that resistance will develop in the field

The mechanism of insecticidal activity of *B thuringiensis* crystal proteins has been studied extensively in the past decade It has been shown that the crystal proteins are toxic to the larval form of the insect only after ingestion of the protein In lepidopteran larvae, an alkaline pH and proteolytic enzymes in the insect mid-gut solubilize the proteins, thereby allowing the release of components that are toxic to the insect These toxic components disrupt the mid-gut cells, cause the insect to cease feeding and eventually, bring about insect death For this reason, *B thuringiensis* toxins have proven themselves to be effective and environmentally safe insecticides in dealing with various insect pests Coleopteran and hemipteran insects and likely dipteran lygus and other piercing and sucking insects exhibit a gut pH that is slightly acidic and so the Bt toxins that are effective against lepidopteran larvae are ineffective against these pests The slightly acidic pH of the gut of these insects is also believed to be more hospitable to the compositions of the present invention, and without intending to be limited to a particular theory, it is likely that the alkaline pH of the gut of lepidopteran larvae is the reason that prior attempts to exhibit dsRNA efficacy has failed (Fire et al US Patent No 6,506,559, Mesa et al Patent Publication No US2003/0150017, Rajagopal et al , 2002, J Biol Chem 277 46849-46851, Tabara et al 1998 Science 282 430-431) It is believed therefore that the dsRNA methods disclosed herein should be preferentially used in compositions and in plants to control coleopteran, dipteran, hemipteran, lygus, and piercing and sucking insects The methods and compositions set forth herein are particularly useful for targeting genes for suppression in insects exhibiting a gut pH of from about 4 5 to about 9 5, or from about 5 0 to about 9 0 or from about 5 5 to about 8 5, or from about 6 0 to about 8 0 or from about 6 5 to about 7 7, or from about 6 8 to about 7 6, or about 7 0 However, insects and other pest species that exhibit a gut pH of from about 7 5 to about 11 5, or from about 8 0 to about 11 0 or from about 9 0 to about 10 0, such as lepidopteran insect larvae, are also intended to be within the scope of the present invention This is particularly true when a dsRNA specific

for inhibiting a gene in a lepidopteran larvae is provided in the diet of the larvae along with one or more Bt proteins, that, with respect to the Bt protein would ordinarily be toxic to that lepidopteran larvae when provided at or above a threshold level The presence of one or more Bt toxins toxic to the same insect species would effectively reduce the gut pH, providing a stable environment for the double stranded RNA molecules to exert their effects in suppressing a target gene in the insect pest

It would be useful to combine one or more stabilized dsRNA constructs producing dsRNA molecules of the present invention in the diet of a target insect pest along with one or more insecticidal proteins such that the dsRNA and the insecticidal protein are toxic to the same insect pest The insecticidal protein could be derived from *B thuringiensis* but also from other organisms known in the art to produce insecticidal proteins such as bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes (e g *Photorhabdus* sp , *Xenorhabdus* sp), *Serratia entomophila* and related *Serratia* sp , *B sphaericus B cereus, B laterosporus, B popilliae Clostridium bifermentans* or other spore-forming gram-positive bacteria that exhibit insecticidal properties Likewise, it is envisioned that two or more different stabilized dsRNA constructs producing dsRNA molecules of the present invention could be provided together within a single plant to ensure durability of the insect control phenotype These dsRNA molecules could target the same gene for silencing or, alternatively target different genes for silencing Two or more different dsRNA's can be combined together in the same plant, each dsRNA being toxic to a different insect pest neither of the dsRNA s being toxic to the same insect species

It is anticipated that the combination of certain stabilized dsRNA constructs with one or more insect control protein genes will result in synergies that enhance the insect control phenotype of a transgenic plant Insect bioassays employing artificial diet- or whole plant tissue can be used to define dose-responses for larval mortality or growth inhibition using both dsRNAs and insect control proteins One skilled in the art can test mixtures of dsRNA molecules and insect control proteins in bioassay to identify combinations of actives that are synergistic and desirable for deployment in insect-protected plants (Tabashnik, 1992) Synergy in killing insect pests has been reported between different insect control proteins (for review see Schnepf *et al* 1998) It is anticipated that synergies will exist between certain dsRNAs and between certain dsRNAs and certain insect control proteins

It is also anticipated that combinations of dsRNA s will reveal unexpected toxicity towards certain insect pests Rajagopol *et al* (2002 J Biol Chem 277 46849-46851) reported that feeding dsRNAs to larvae of the lepidopteran pest *S litura* was ineffective in silencing a gene encoding a midgut aminopeptidase It is worth noting that the alkaline pH environment of the typical lepidopteran midgut may be a hostile environment for dsRNAs since the denaturation of RNA duplexes at alkaline pH would be expected to lead to rapid degradation Pores formed by *B thuringiensis* toxin proteins inserted into the midgut epithelial membrane, result in a neutralization of the midgut pH (reviewed in Gill 1995, Mem Inst Osaldo Cruz, Rio de Janeiro, 90 69-74) Accordingly, *B thuringiensis* toxin proteins that are only capable of forming transient ion channels in the lepidopteran midgut epithelial membrane without causing mortality may be sufficient to reduce the midgut pH to levels more conducive for the uptake of dsRNAs by midgut epithelial cells As one example it is known that the Cry1Ac protein is not an effective toxin against the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Chambers *et al*, 1991, J Bacteriol 173 3966-3976) Nevertheless, transient reductions in midgut pH caused by the Cry1Ac protein could serve to stabilize co-ingested dsRNAs and render them effective in silencing *S exigua* target genes, thereby providing an unexpected means of controlling this insect pest This effect could be observed

with any protein insecticidal or not, that disrupts the ion regulation of lepidopteran insect midgut cells, and may also be effective in coleopteran, dipteran, hemipteran, lygus bug and other piercing and sucking insect species, and the like

Some insecticidal proteins from *B thuringiensis*, such as the Cyt proteins, may cause transient openings in the midgut epithelial membrane of sensitive insect larvae due to the formation of structured pores or to the general detergent-like activity of the protein (Butko 2003 Appl Environ Microbiol 69 2415-2422) Such openings could facilitate the passage of dsRNA molecules into midgut epithelial cells even at protein concentrations that are sub-optimal for causing mortality It is anticipated that any protein insecticidal or not that causes transient openings in the epithelial membranes of insects could facilitate the passage of dsRNA molecules into insect cells and promote gene silencing

The nucleotide sequences provided as set forth in SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 or in SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 as set forth in the sequence listing or fragments thereof or complements thereof can be "provided' in a variety of mediums to facilitate use Such a medium can also provide a subset thereof in a form that allows a skilled artisan to examine the sequences

Commodity products containing one or more of the sequences of the present invention, and produced from a recombinant plant or seed containing one or more of the nucleotide sequences of the present invention are specifically contemplated as embodiments of the present invention A commodity product containing one or more of the sequences of the present invention is intended to include, but not be limited to, meals, oils, crushed or whole grains or seeds of a plant, or any food product comprising any meal, oil or crushed or whole grain of a recombinant plant or seed containing one or more fo the sequences of the present invention The detection of one or more of the sequences of the present invention in one or more commodity or commodity products contemplated herein is defacto evidence that the commodity or commodity product is composed of a transgenic plant designed to express one or more of the nucleotides sequences of the present invention for the purpose of controlling insect infestation using dsRNA mediated gene suppression methods

In one application of this embodiment a nucleotide sequence of the present invention can be recorded on computer readable media As used herein, 'computer readable media' refers to any tangible medium of expression that can be read and accessed directly by a computer Such media include, but are not limited to magnetic storage media such as floppy discs hard disc storage medium, and magnetic tape optical storage media such as CD-ROM, electrical storage media such as RAM and ROM, optical character recognition formatted computer files, and hybrids of these categories such as magnetic/optical storage media A skilled artisan can readily appreciate that any of the presently known computer readable mediums can be used to create a manufacture comprising computer readable medium having recorded thereon a nucleotide sequence of the present invention

As used herein, "recorded" refers to a process for storing information on computer readable medium A skilled artisan can readily adopt any of the presently known methods for recording information on computer readable medium to generate media comprising the nucleotide sequence information of the present invention A variety of data storage structures are available to a skilled artisan for creating a computer readable medium having recorded thereon a nucleotide sequence of the present invention The choice of the data storage structure will generally be based on the means chosen to access the stored information In addition a variety of data processor programs and formats can be used to store the nucleotide sequence information of the present

invention on computer readable medium The sequence information can be represented in a word processing text file formatted in commercially-available software such as WordPerfect and Microsoft Word or represented in the form of an ASCII text file, stored in a database application, such as DB2, Sybase, Oracle, or the like The skilled artisan can readily adapt any number of data processor structuring formats (e g text file or database) in order to obtain computer readable medium having recorded thereon the nucleotide sequence information of the present invention

Computer software is publicly available which allows a skilled artisan to access sequence information provided in a computer readable medium Software that implements the BLAST (Altschul *et al*, *J Mol Biol 215* 403-410 (1990)) and BLAZE (Brutlag, *et al*, *Comp Chem 17* 203-207 (1993)) search algorithms on a Sybase system can be used to identify open reading frames (ORFs) within sequences such as the Unigenes and EST s that are provided herein and that contain homology to ORFs or proteins from other organisms Such ORFs are protein-encoding fragments within the sequences of the present invention and are useful in producing commercially important proteins such as enzymes used in amino acid biosynthesis, metabolism, transcription, translation RNA processing nucleic acid and a protein degradation protein modification, and DNA replication restriction, modification, recombination and repair

The present invention further provides systems, particularly computer-based systems, which contain the sequence information described herein Such systems are designed to identify commercially important fragments of the nucleic acid molecule of the present invention As used herein, 'a computer-based system" refers to the hardware means, software means, and data storage means used to analyze the nucleotide sequence information of the present invention The minimum hardware means of the computer-based systems of the present invention comprises a central processing unit (CPU), input means, output means, and data storage means A skilled artisan can readily appreciate that any one of the currently available computer-based system are suitable for use in the present invention

The most preferred sequence length of a target sequence is from about 10 to about 100 amino acids or from about 23 to about 300 nucleotide residues

As used herein, "a target structural motif,' or "target motif,' refers to any rationally selected sequence or combination of sequences in which the sequences or sequence(s) are chosen based on a three-dimensional configuration that is formed upon the folding of the target motif There are a variety of target motifs known in the art Protein target motifs include, but are not limited to, enzymatic active sites and signal sequences Nucleic acid target motifs include, but are not limited to, promoter sequences cis elements hairpin structures and inducible expression elements (protein binding sequences)

EXAMPLES

The inventors herein have identified a means for controlling invertebrate pest infestation by providing a double stranded ribonucleic acid molecule in the diet of the pest Surprisingly the inventors have discovered that a double stranded ribonucleic acid molecule functions upon ingestion by the pest to inhibit a biological function in the pest resulting in one or more of the following attributes reduction in feeding by the pest, reduction in viability of the pest, death of the pest, inhibition of differentiation and development of the pest, absence of or reduced capacity for sexual reproduction by the pest, muscle formation, juvenile hormone formation juvenile hormone regulation, ion regulation and transport, maintenance of cell membrane potential,

amino acid biosynthesis, amino acid degradation, sperm formation pheromone synthesis, pheromone sensing, antennae formation wing formation leg formation development and differentiation, egg formation, larval maturation digestive enzyme formation, haemolymph synthesis, haemolymph maintenance, neurotransmission, cell division energy metabolism, respiration, apoptosis, and any component of a eukaryotic cells' cytoskeletal structure, such as for example, actins and tubulins Any one or any combination of these attributes can result in an effective inhibition of pest infestation, and in the case of a plant pest, inhibition of plant infestation For example when used as a diet composition containing a pest inhibitory sufficient amount of one or more double stranded ribonucleic acid molecules provided topically to a plant, as a seed treatment, as a soil application around a plant or when produced by a plant from a recombinant DNA molecule present within the cells of a plant plant pest infestation is unexpectedly dramatically reduced The Examples set forth herein below are illustrative of the invention when applied to a single pest However, the skilled artisan will recognize that the methods formulae, and ideas presented in the Examples are not intended to be limiting, and are applicable to all invertebrate pest species that can consume food sources that can be formulated to contain a sufficient amount of a pest inhibitory agent consisting at least of one or more double stranded RNA molecules exemplified herein intended to suppress some essential feature about or function within the pest

Example 1

This example illustrates the identification of nucleotide sequences that, when provided in the form of double stranded RNA molecules in the diet of a corn rootworm, are useful for controlling corn rootworms

Corn rootworm cDNA libraries (LIB149, LIB 150, LIB3027, LIB3373) were constructed from whole larvae and from dissected midgut sections, and nucleotide sequence information was obtained (see Andersen et al US Patent Application Serial No 10/205,189 filed July 24, 2002, incorporated herein specifically by reference in its entirety) In addition, cDNA libraries were constructed from whole larvae at different developmental stages and at different times within each developmental stage in order to maximize the number of different EST sequences from the *Diabrotica* species Libraries LIB5444 and LIB5462 were constructed respectively from mRNA pools obtained from first (1 gram) and third (2 9 grams) instar Western Corn Rootworm larvae Harvested insects were rapidly frozen by insertion into liquid nitrogen The insects were ground in a mortar and pestle maintained at or below –20C by chilling on dry ice and/or with the addition of liquid nitrogen to the mortar until the tissue was ground into a fine powder RNA was extracted using TRIzol® reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions Poly A+ RNA was isolated from the total RNA prep using Dynabeads Oligo dT (Dynal Inc , NY) following the manufacturer's instructions A cDNA library was constructed from the Poly A+ RNA using the SuperScript™ Plasmid System (Invitrogen) cDNA was size fractionated using chromatography The fourth and fifth fractions were collected and ligated into the pSPORT1 vector (Life Technologies Inc Gaithersburg MD) between the *Sal*I and *Not*I restriction endonucleases recognition sites, and transformed into *E coli* DH10B electro-competent cells by electroporation The first instar larvae library yielded about 420 000 colony-forming units The third instar larvae library yielded about 2 78 x 10^6 colony forming units Colonies from LIB149, LIB150 were washed from the plates, mixed to uniformity by vortexing briefly, and pooled into Tris-EDTA buffer Half of the wash was brought to 10% glycerol aliquoted into cryovials and stored at –70C The other half was used to produce plasmid DNA using a

Qiagen midi-prep purification column or its equivalent Purified plasmid DNA was aliquoted to microcentrifuge tubes and stored at –20C

Colonies from the Diabrotica virgifera cDNA libraries LIB5444 and LIB5462 were amplified individually in a high viscosity medium Approximately 200 000 colony-forming units from LIB5444 and 600,000 colony-forming units from LIB5462 were mixed on a stir plate separately in 500 ml LB medium containing 0 3% SeaPrep agarose® and 50 mg/l carbenecillin at 37°C and then rapidly cooled in a water/ice bath for 1 hour allowing uniform suspension of the bacterial colonies The inoculated libraries were then grown at 30°C for 42 hours After incubation, the cells were mixed for 5 minutes on a stir plate The medium was then transferred to two 250 ml centrifuge bottles The bacterial cells were pelleted at 10,000 x g for 10 minutes The medium was removed from the bottles and the cells were resuspended in a total of 20 ml of LB medium with 50 mg/l carbenecillin Dimethyl sulfoxide was added to 10% to preserve the cells in freezing Both libraries were amplified to a final titer of 10^8 colony-forming units per milliliter Samples of the *Diabrotica virgifera* cDNA libraries LIB5444 and LIB5462 were combined and adjusted to a DNA concentration of about 1 25 micrograms per microliter in sterile distilled and deionized water and aliquoted into twenty five cryovials, each cryovial containing about 8 75 micrograms of DNA These samples were deposited by the applicant(s)/inventors with the American Type Culture Collection (ATCC) located at 10801 University Boulevard, Manassas Virginia USA ZIP 20110-2209 on June 10 2004 and referred to as LIB5444/62 The ATCC provided the Applicant with a deposit receipt, assigning the ATCC Deposit Accession No PTA-6072

Corn rootworm high molecular weight cDNA libraries, i e , LIB5496 and LIB5498, were prepared essentially as described above for the production of corn rootworm cDNA libraries Libraries LIB5496 and LIB5498 were constructed respectively from mRNA pools obtained from first (1 gram) and second and third (1 gram) instar Western Corn Rootworm larvae Briefly, insects were quickly frozen in liquid nitrogen The frozen insects were reduced to a fine powder by grinding in a mortar and pestle RNA was extracted using TRIzol® reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions Poly A+ RNA was isolated from the total RNA prep using Dynabeads Oligo dT (Dynal Inc NY) A high molecular weight cDNA library was made from 20 micrograms of Poly A+ RNA using the SuperScript™ Plasmid System (Invitrogen) The cDNA was size fractionated on a 1% agarose gel in 1AE and cDNA between the range of 1 Kb to 10 Kb was collected and ligated into the pSPORT1 vector in between the *Sal*I and *Not*I restriction sites and transformed into *E coli* DH10B electro-competent cells by electroporation LIB5496 yielded a total titer of about 3 5 x 10^6 colony forming units LIB5498 yielded a total titer of about 1 0 x 10^6 colony forming units Colonies from the corn rootworm high molecular weight cDNA libraries LIB5496 and LIB5498 were amplified individually in a high viscosity medium Approximately 600,000 colony-forming units from LIB5496 and LIB5498 were mixed on a stir plate separately in 500 ml LB medium containing 0 3% SeaPrep agarose® and 50 mg/l carbenecillin at 37°C and then rapidly cooled in a water/ice bath for 1 hour allowing uniform suspension of the bacterial colonies The libraries were then grown at 30°C for 42 hours After incubation the cells were mixed for 5 minutes on a stir plate The medium was then transferred to two 250 mL centrifuge bottles The bacterial cells were pelleted at 10 000 xg for 10 minutes The medium was removed from the bottles and the cells were resuspended in a total of 20 mL of LB medium with 50 mg/L carbenecillin Dimethyl sulfoxide was added to 10% to preserve

the cells in freezing Both libraries were amplified to a final titer of 10^8 colony-forming units per milliliter Inserted cDNA sequence information was obtained from the corn rootworm species-specific plasmid libraries

The Andersen et al rootworm libraries together with additional sequences from the libraries LIB5444 and LIB5462 initially produced about 18,415 individual EST sequences consisting of approximately 1.0×10^7 nucleotide residues The average length of an EST sequence was about 586 nucleotide residues These EST sequences were subjected to bioinformatics algorithms that resulted in the assembly of contig sequences referred to herein as UNIGENE sequences, and individual EST sequences that could not be compiled by overlap identity with other EST sequences, referred to herein as singletons The LIB5444 and LIB5462 libraries were then sequenced much deeper, resulting in additional individual EST sequences EST sequences obtained from libraries, i e , LIB149, LIB150, LIB3027, LIB3373, LIB5444, LIB5462, LIB5496 and LIB5503 are set forth in the sequence listing from , SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 and SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174

EST sequences isolated from CRW cDNA libraries were assembled, where possible, into UNIGENE sets and these assembled Unigene sequences are listed in the sequence listing as set forth in A UNIGENE is a gene-oriented cluster formed from the overlap of individual EST sequences within regions of sequence identity to form a larger sequence Pontius et al , Nucl Acids Res 31 28-33 (2003) Each nucleotide sequence as set forth in the sequence listing was analyzed to identify the presence of open reading frames Amino acid sequence information deduced from open reading frames was compared to known amino acid sequence information available in public databases in order to deduce the extent of amino acid sequence identity or similarity to those known amino acid sequences Biological function, if any, associated with known amino acid sequences in public databases was annotated to the amino acid sequences deduced from the cDNA library nucleotide sequence information Annotations provided information that was suggestive of the function of a protein that may be expressed from a particular gene that gave rise to a particular cDNA sequence, but was not outcome determinative Based on the suggestive annotation information, certain cDNA sequences were characterized as those that encoded a protein that was likely involved in some biological function within corn rootworm cells that was either essential to life, or that was necessary for ensuring health and vitality to a cell, or were likely to be involved in cellular integrity cell maintenance reproductive capacity, and the like

Several cDNA sequences were selected from this subset of cDNA sequences likely encoding proteins, the inhibition of which was likely to cause morbidity or mortality to CRW or to other invertebrate species cells These sequences were then used in the construction of double stranded RNA molecules for incorporation into CRW diet

Thermal amplification primer pairs were designed based on the cDNA sequences reported in the CRW cDNA library Primer pairs were constructed either as a pair of nucleotide sequences, each member of a primer pair exhibiting perfect complementarity either to a sense or to an antisense sequence Some primer pair sequences were constructed so that each member of the pair exhibited a sequence containing a T7 phage RNA polymerase promoter at it's 5 end as set forth for example, in SEQ ID NO 5 from nucleotide position 1 through nucleotide position 23 Preferably a higher fidelity first amplification reaction was carried out using a first primer pair lacking a T7 promoter to generate a first amplicon using CRW genomic DNA as template Preferably a cDNA or a mRNA sequence is used as the template for the synthesis of a dsRNA molecule for use in the present invention because eukaryotic genome sequences are recognized in the art to contain sequences

that are not present within the mature RNA molecule A sample of the first amplicon generated from the higher fidelity first amplification reaction was then used as template in a second thermal amplification reaction with a second primer pair containing the T7 promoter sequence to produce a second amplicon that contained a T7 promoter at or embedded within the 5' end of each strand of the second amplicon The complete nucleotide sequence of the second amplicon was obtained in both directions and compared to the nucleotide sequence as reported for the cDNA, and discrepancies between the two sequences, if any, were noted Generally, sequences prepared using genome DNA as template were inconsistent with further use as dsRNA molecules for use in achieving significant levels of suppression because of variations within the genome sequences that were not present within the mRNA or cDNA sequence

An *in vitro* transcription reaction typically contained from about 1 to about 2 micrograms of linearized DNA template T7 polymerase reaction buffer from a 10X concentrate ribonucleotides ATP, CTP, GTP, and UTP at a final concentration of from between 50 and 100 mM each, and 1 unit of T7 RNA polymerase enzyme The RNA polymerase reaction was incubated at about 37C depending on the optimal temperature of the RNA polymerase used according to the manufacturers' instructions, for a period of time ranging from several minutes to several hours Generally, reactions were carried out for from about 2 to about 6 hours for transcription of template sequences up to about 400 nucleotides in length, and for up to 20 hours for transcription of template sequences greater than about 400 nucleotides in length Heating the reaction to 65C for fifteen minutes terminates RNA transcription RNA transcription products were precipitated in ethanol washed, air dried and resuspended in RNAse free water to a concentration of about 1 microgram per microliter Most transcripts which took advantage of the opposing T7 promoter strategy outlined above produced double stranded RNA in the *in vitro* transcription reaction, however, a higher yield of double stranded RNA was obtained by heating the purified RNA to 65C and then slowly cooling to room temperature to ensure proper annealing of sense and antisense RNA segments Double stranded RNA products were then incubated with DNAse I and RNAse at 37C for one hour to remove any DNA or single stranded RNA present in the mixture Double stranded RNA products were purified over a column according to the manufacturers instructions (AMBION MEGASCRIPT RNAi KIT) and resuspended in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7 5) or RNAse free water to a concentration of between 0 1 and 1 0 microgram per microliter

A sample of double stranded RNA was either added directly to each well containing insect diet as indicated above or was modified prior to being added to insect diet Modification of double stranded RNA followed the instructions for RNAse III (AMBION CORPORATION, Austin, Texas) or DICER (STRATAGENE, La Jolla California) provided by the manufacturer RNAse III digestion of double stranded RNA produced twenty-one and twenty-two nucleotide duplexes containing 5' phosphorylated ends and 3' hydroxyl ends with 2-3 base overhangs similar to the ~21-26 base pair duplexed short interfering RNA (siRNA) fragments produced by the dicer enzyme in the eukaryotic pathway identified by Hamilton et al (Science, 1999 286 950-952) and Elbashir et al (Genes & Development, 2001 15 188-200) This collection of short interfering RNA duplexes was further purified and a sample characterized by polyacrylamide gel electrophoresis to determine the integrity and efficiency of duplex formation The purity and quantity of the sample was then determined by spectrophotometry at a wavelength of 250 nanometers, and unused sample retained for further use by storage at –20C

Samples of siRNA or full length double stranded RNA (dsRNA) were subjected to bioassay with a selected number of target pests Varying does of dsRNA or siRNA were applied as an overlay to corn rootworm artificial diet according to the following procedure *Diabrotica virgifera virgifera* (WCR) eggs were obtained from Crop Characteristics, Inc , Farmington, Minnesota The non-diapausing WCR eggs were incubated in soil for about 13 days at 24C, 60% relative humidity, in complete darkness On day 13 the soil containing WCR eggs was placed between #30 and #60 mesh sieves and the eggs were washed out of the soil using a high pressure garden hose The eggs were surface disinfested by soaking in LYSOL for three minutes, rinsed three times with sterile water, washed one time with a 10% formalin solution and then rinsed three additional times in sterile water Eggs treated in this way were dispensed onto sterile coffee filters and hatched overnight at 27C, 60% relative humidity in complete darkness

Insect diet was prepared essentially according to Pleau et al (Entomologia Experimentalis et Applicata, 2002, 105 1-11), with the following modifications 9 4 grams of SERVA agar was dispensed into 540 milliliters of purified water and agitated until the agar was thoroughly distributed The water/agar mixture was heated to boiling to completely dissolve the agar, and then poured into a WARING blender The blender was maintained at low speed while 62 7 grams of BIO-SERV DIET mix (F9757), 3 75 grams lyophilized corn root, 1 25 milliliters of green food coloring, and 0 6 milliliters of formalin was added to the hot agar mixture The mixture was then adjusted to pH 9 0 with the addition of a 10% potassium hydroxide stock solution The approximately 600 milliliter volume of liquid diet was continually mixed at high speed and maintained at from about 48C to about 60C using a sterilized NALGENE coated magnetic stir bar on a magnetic stirring hot plate while being dispensed in aliquots of 200 microliters into each well of FALCON 96-well round bottom microtiter plates The diet in the plates was allowed to solidify and air dry in a sterile biohood for about ten minutes

Thirty (30) microliter volumes of test samples containing either control reagents or double stranded RNA in varying quantities was overlayed onto the surface of the insect diet in each well using a micro-pipettor repeater Insect diet was allowed to stand in a sterile biohood for up to one half hour after application of test samples to allow the reagents to diffuse into the diet and to allow the surface of the diet to dry One WCR neonate larva was deposited to each well with a fine paintbrush Plates were then sealed with MYLAR and ventilated using an insect pin 12-72 insect larvae were tested per dose depending on the design of the assay The bioassay plates were incubated at 27C 60% relative humidity in complete darkness for 12-14 days The number of surviving larvae per dose was recorded at the 12-14 day time point Larval mass was determined using a suitable microbalance for each surviving larva Data was analyzed using JMP™4 statistical software (SAS Institute, 1995) and a full factorial ANOVA was conducted with a Dunnet's tet to look for treatment effects compared to the untreated control ($P<0.05$) A Tukey-Kramer post hoc test was performed to compare all pairs of the treatments ($P<0.05$)

The following nucleotide sequences were derived first as cDNA sequences identified in a corn rootworm mid-gut cDNA library (Andersen et al , ibid), and were adapted for use in constructing double stranded RNA molecules for use in testing the efficacy of inhibiting a biological function in a pest by feeding double stranded RNA molecules in the diet of the pest

A Chd3 Homologous Sequence

CHD genes have been identified in numerous eukaryotes and the corresponding proteins are proposed to function as chromatin-remodeling factors The term CHD is derived from the three domains of sequence homology found in CHD proteins a chromo (chromatin organization modifier) domain, a SNF2-related helicase/ATPase domain and a DNA-binding domain, each of which is believed to confer a distinct chromatin-related activity CHD proteins are separated into two categories based on the presence or absence of another domain of sequence homology, a PHD zinc finger domain, typically associated with chromatin related activity CHD3 related proteins possess a PHD zinc finger domain but CHD1 related proteins do not Experimental observations have suggested a role for CHD3 proteins in repression of transcription, and in some species have been shown to be a component of a complex that contains histone deacetylase as a subunit Deacetylation of histones is correlated with transcriptional inactivation and so CHD3 proteins have been implicated to function as repressors of transcription by virtue of being a component of a histone deacetylase complex (Ogas et al , 1999 PNAS 96 13839-13844) Thus, suppression of CHD3 protein synthesis may be a useful target for double stranded RNA mediated inhibition of invertebrate pests

SEQ ID NO 4 corresponds to a CRW midgut cDNA nucleotide sequence, the amino acid sequence translation of which was annotated to be homologous to a *Drosophila melanogaster* CHD3 amino acid sequence (GenBank accession No AF007780) SEQ ID NO 5 and SEQ ID NO 40609 correspond respectively to forward and reverse genome amplification primers (i e , a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA from CRW mRNA pools, or from a cDNA produced from such pools The sequence of such an amplicon corresponds to a part of a CRW gene encoding a homolog of a *D melanogaster* CHD3 amino acid sequence SEQ ID NO 5 contains a T7 polymerase promoter sequence at its 5' end (nucleotides 1-23) linked to a CRW genome primer sequence (arbitrarily assigned as the forward primer sequence) depicted as set forth at SEQ ID NO 5 from nucleotide position 24-45, which corresponds to nucleotide position 31 through nucleotide position 52 as set forth in SEQ ID NO 4 SEQ ID NO 6 contains a T7 polymerase promoter sequence at its 5 end as set forth from nucleotide position 1-23 The T7 promoter sequence is linked at its 3' end to an arbitrarily assigned reverse genome primer sequence corresponding to nucleotide position 24-44 as set forth in SEQ ID NO 6 the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 4 from nucleotide position 298-319 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 5 and SEQ ID NO 6 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template a 335 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 7 is produced, corresponding to a part of the CRW genome that encodes a protein exhibiting about 66% identity to a *Drosophila melanogaster* CHD3 amino acid sequence Nucleotides at position 1-23 and the reverse complement of nucleotides at position 314-335 as set forth in SEQ ID NO 7 correspond to the T7 promoter sequences at either end of the amplicon The amplified genomic nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 7 from nucleotide 24 through nucleotide 313 corresponds substantially to the reported cDNA nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO 4 from nucleotide 31 through nucleotide 319, except that nucleotides at positions 63, 87 117, 177, 198, 213, 219-220 246, 249, and 261 as set forth in SEQ ID NO 4 were reported to be T T, G, G, G, T, T, I, C, C and A respectively while the corresponding positions in alignment with SEQ ID NO 7 contained C C, A, A A, C, A, C, G A and G at nucleotide positions 56, 80, 110, 170, 191, 206, 212-213, 239, 242, and 254 This difference corresponds to about a 4% difference in the nucleotide sequence composition between the previously reported cDNA sequence and the sequence of the

amplicon produced from genome DNA template consistent with the earlier report that the cDNA sequence was likely less than 99% accurate (Andersen et al , ibid)

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 7 was cloned into a plasmid vector capable of replication in *E coli* and sufficient amounts of plasmid DNA was recovered to allow for *in vitro* T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned fragment Double stranded RNA was produced and subjected to bioassay one RNA segment consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 7 from about nucleotide position 24 at least through about nucleotide position 313 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 7 the other RNA segment being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 7 from about nucleotide position 313 at least through about nucleotide position 24, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) was treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA were overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae were allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 4 exhibited significant growth inhibition and mortality compared to controls

Other nucleotide sequences derived from CRW were also tested in bioassay in parallel with the CHD3 sequences including nucleotide sequences annotated to likely encode CRW equivalents of proteins such as beta-tubulin protein 40 kDa V-ATPase subunit protein elongation factor proteins EF1α and EF1α 48D, 26S proteosome subunit p28 protein, juvenile hormone epoxide hydrolase protein, swelling dependent chloride channel protein, glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase protein, actin 42A protein, ADP-ribosylation factor 1 protein, transcription factor IIB, chitinase proteins, and a ubiquitin conjugating enzyme

A Beta-tubulin homologous sequence

Tubulin proteins are important structural components of many cellular structures in all eukaryote cells and principally in the formation of microtubules Inhibition of microtubule formation in cells results in catastrophic effects including interference with the formation of mitotic spindles blockage of cell division, and the like Therefore, suppression of tubulin protein formation may be a useful target for double stranded RNA mediated inhibition

A beta-tubulin related sequence derived from CRW was identified for use in the present invention SEQ ID NO 18 corresponds to a CRW midgut cDNA nucleotide sequence, the amino acid sequence translation of which was annotated to be homologous in part to a *Manduca sexta* beta-1-tubulin amino acid sequence and in part to a *Drosophila melanogaster* beta-1-tubulin amino acid sequence (GenBank accession No s AF030547 and M20419 respectively) SEQ ID NO 19 and SEQ ID NO 20 correspond respectively to forward and reverse genome amplification primers (i e , a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA, from CRW mRNA pools or from a cDNA produced from such pools The sequence of such an amplicon corresponds to all or a part of a CRW gene encoding a beta-tubulin protein SEQ ID NO 19 and SEQ ID NO 20 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-44 as set forth in SEQ ID NO 19 correspond to nucleotides 96-116 as set forth in SEQ ID NO 18 Nucleotides 24-44 as set forth in SEQ ID NO 20 correspond to the reverse complement of the sequence as set

forth in SEQ ID NO 18 from nucleotides 428-448 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 19 and SEQ ID NO 20 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template a 399 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 21 is produced, corresponding substantially to a part of the CRW genome encoding a protein exhibiting substantial identity to a beta-tubulin protein homolog present in *Drosophila melanogaster* and *Manduca sexta* The nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 21 corresponds substantially to the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO 18 from nucleotides 96-448 No sequence differences were observed between the genome amplicon sequence and the corresponding sequence within the cDNA sequence

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 21 was cloned into a plasmid vector, and sufficient amounts of plasmid DNA was recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA was produced and a sample was subjected to bioassay, one RNA segment, the sense strand, consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 21 from about nucleotide position 24 at least through about nucleotide position 376 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 21, the reverse complement RNA segment or the anti-sense strand, being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 21 from about nucleotide position 376 at least through about nucleotide position 24, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) was treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA s (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA were overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae were allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 18 exhibited significant growth inhibition and mortality compared to controls

A 40 kDa V-A I Pase homologous sequence

Energy metabolism within subcellular organelles in eukaryotic systems is an essential function Vacuolar A I P synthases are involved in maintaining sufficient levels of A I P within vacuoles Therefore, vacuolar ATP synthases may be a useful target for double stranded RNA mediated inhibition

A nucleotide sequence encoding a protein that displayed similarity to a 40 kDa V-ATPase was derived from CRW An amino acid sequence translation of SEQ ID NO 32 exhibited homology to a *Manduca sexta* 40-kDa V-ATPase subunit amino acid sequence (GenBank accession No X98825) SEQ ID NO 33 and SEQ ID NO 34 correspond respectively to forward and reverse genome amplification primers (i e a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA CRW mRNA pools, or a CRW cDNA derived from such pools The sequence of such an amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene encoding a 40 kDa V-ATPase homologous protein However the nucleotide sequence of an amplicon derived using CRW genomic DNA as template was inconsistent with the reported cDNA sequence as set forth in SEQ ID NO 32

SEQ ID NO 33 and SEQ ID NO 34 represent thermal amplification primers Each primer contains a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-40 as set forth in SEQ ID NO 33 correspond to nucleotides 95-111 as set forth in SEQ ID NO 32 Nucleotides 24-43 as set forth in SEQ ID NO 34 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 32 from nucleotides 362-381 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 33 and SEQ ID NO 34 in an

amplification reaction with CRW genomic DNA template, a 291 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 35 is produced SEQ ID NO 35 from nucleotide 24 through nucleotide 268 exhibited only about 50% homology to the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 32 based on a Martinez/Needleman-Wunsch DNA alignment The amplicon sequence derived using the selected thermal amplification primer pair was inconsistent with the reported sequence as set forth in SEQ ID NO 32 Preferably, an amplicon is produced using a CRW mRNA pool or a cDNA derived from such pool

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 32 from about nucleotide position 95 through about nucleotide position 381 was produced and cloned into a plasmid vector, and sufficient amounts of plasmid DNA were recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA was produced and a sample subjected to bioassay, one RNA segment the sense strand, consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 32 from about nucleotide position 95 at least through about nucleotide position 381except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 32, and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 32 from about nucleotide position 381 at least through about nucleotide position 95, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) was treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA were overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae were allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 32 exhibited significant growth inhibition and mortality compared to controls

A EF1α homologous sequence

Transcription elongation and transcription termination factors are essential to metabolism and may be advantageous targets for double stranded RNA mediated inhibition

At least two CRW cDNA sequences were identified for use in the present invention that were predicted to encode elongation factor 1 alpha (EF1α) homologs

The amino acid sequence translation of a singleton CRW cDNA sequence as set forth in SEQ ID NO 36 exhibited homology to a *Drosophila melanogaster* EF-1-alpha amino acid sequence (GenBank Accession No X06870) Other sequences predicted to encode EF1α homologous proteins were also identified from within the CRW cDNA midgut library These sequences were aligned to produce a UNIGENE sequence as set forth in SEQ ID NO 40 which was predicted to encode an EF1α protein homolog referred to herein as 48D Several of the sequences comprised within this singleton were predicted to encode amino acid sequences exhibiting homology to various EF1α homologous protein sequences including but not limited to a *Bombyx mori* EF1α (GenBank Accession No D13338) a *Artemia* species EF1α (GenBank Accession No X03704), a *Spragueia leo* EF1α (GenBank Accession No U85680), a *Apis mellifera* EF1α (GenBank Accession No AF015267) a *Anisakis simplex* EF1α (GenBank Accession No AI250539), a *Papaipema* species EF1α (GenBank Accession No AF151628), a *Ephedrus persicae* EF1α (GenBank Accession No Z83663), a *Papilio garamas* EF1α (GenBank Accession No AF044833), a *Alysia lucicola* EF1α (GenBank Accession No

Z83667) a *Bracon* species EF1α (GenBank Accession No Z83669), a *Histeromerus mystacinus* EF1α (GenBank Accession No Z83666) and a *Caenorhabditis elegans* EF1α (GenBank Accession No U41534)

One CRW cDNA sequence predicted to encode a part of an EF1α homolog is referred to herein as the B2 sequence and is set forth at SEQ ID NO 36 SEQ ID NO 37 and SEQ ID NO 38 correspond respectively to forward and reverse genome amplification primers (i e , a primer pair, with reference to corresponding or reverse complement sequences as set forth in SEQ ID NO 36) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA, CRW mRNA pools, or from a cDNA derived from such mRNA pools The sequence of such an amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene encoding an EF1α homologous protein However the nucleotide sequence of an amplicon derived when CRW genomic DNA was used as template was inconsistent with the reported cDNA sequence as set forth in SEQ ID NO 36

SEQ ID NO 37 and SEQ ID NO 38 represent sequences for thermal amplification primers Each primer contains a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-44 as set forth in SEQ ID NO 37 correspond to nucleotides 8-29 as set forth in SEQ ID NO 36 Nucleotides 24-42 as set forth in SEQ ID NO 38 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 36 from nucleotides 310-328 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 37 and SEQ ID NO 38 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template, a 933 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 39 was produced The nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 39 was inconsistent with the nucleotide sequence from nucleotide position 8 through nucleotide position 328 as set forth in SEQ ID NO 36 Preferably an amplicon is produced using a CRW mRNA pool or a cDNA derived from such pool such as for example SEQ ID NO 36

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 36 from about nucleotide position 8 through about nucleotide position 328 was produced using CRW mRNA pools or cDNA prepared from such pools and cloned into a plasmid vector Sufficient amounts of plasmid DNA were recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA was produced and a sample subjected to bioassay, one RNA segment, the sense strand consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 36 from about nucleotide position 8 at least through about nucleotide position 328 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 36, and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand, being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 36 from about nucleotide position 328 at least through about nucleotide position 8 uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) was treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA were overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae were allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 36 exhibited significant growth inhibition and mortality compared to controls

The sequence as set forth in SEQ ID NO 40 was used to design a primer pair for use in amplifying a CRW genomic DNA sequence encoding a EF1α 48D homologous protein sequence SEQ ID NO 41 and SEQ ID NO 42 correspond respectively to forward and reverse genome amplification primers (i e , a primer pair) SEQ ID NO 41 and SEQ ID NO 42 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide

positions 1-23 respectively Nucleotides 24-41 as set forth in SEQ ID NO 41 correspond to nucleotides 61-79 as set forth in SEQ ID NO 40 Nucleotides 24-45 as set forth in SEQ ID NO 42 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 40 from nucleotides 562-583 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 41 and SEQ ID NO 42 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template a 569 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 43 is produced, corresponding substantially to a part of the CRW genome encoding a protein exhibiting substantial identity to a EF1α protein also present in *Drosophila melanogaster* The nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 43 from about nucleotide 24 through about nucleotide 546 corresponds substantially to the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO 40 from about nucleotides 61-583 No sequence differences were observed between the genome amplicon sequence and the corresponding sequence within the cDNA sequence

The amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 43 was cloned into a plasmid vector, and sufficient amounts of plasmid DNA was recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA was produced and a sample was subjected to bioassay one RNA segment the sense strand, consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 43 from about nucleotide position 24 at least through about nucleotide position 546 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 43, and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 43 from about nucleotide position 546 at least through about nucleotide position 24, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) was treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA were overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae were allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 43 exhibited significant growth inhibition and mortality compared to controls

A 26S proteosome subunit p28 homologous sequence

The 26S proteasome is a large, ATP-dependent, multi-subunit protease that is highly conserved in all eukaryotes It has a general function in the selective removal of various short-lived proteins that are first covalently linked to ubiquitin and then subsequently degraded by the 26S proteasome complex The ubiquitin pathway plays an important role in the control of the cell cycle by the specific degradation of a number of regulatory proteins including mitotic cyclins and inhibitors of cyclin-dependent kinases such as p27 of mammalian cells Thus, the suppression of 26S proteasome synthesis and suppression of synthesis of its component subunits may be preferred targets for double stranded RNA mediated inhibition (Smith et al Plant Phys 1997 113 281-291)

A cDNA sequence derived from a CRW mid-gut library was identified as being partially homologous to a 26S proteosome subunit amino acid sequence and was used in the present invention SEQ ID NO 44 corresponds substantially to a CRW midgut cDNA nucleotide sequence An amino acid sequence translation of SEQ ID NO 44 exhibited homology to a 26S proteasome subunit p28 protein (GenBank Accession No AB009619) SEQ ID NO 45 and SEQ ID NO 46 correspond respectively to forward and reverse genome

amplification primers (i e , a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA, from CRW mRNA pools and from cDNA produced from such pools An amplicon produced in this way should exhibit a sequence that encodes all or a part of a CRW gene encoding a homolog of a 26S proteosome subunit protein SEQ ID NO 45 and SEQ ID NO 46 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-46 as set forth in SEQ ID NO 45 correspond to nucleotides 130-152 as set forth in SEQ ID NO 34 Nucleotides 24-41 as set forth in SEQ ID NO 46 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 44 from nucleotides 423-440 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 44 and SEQ ID NO 46 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template, a 1113 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 47 was produced The sequence as set forth in SEQ ID NO 47 did not correspond to the sequence as set forth in SEQ ID NO 44, and therefore was inconsistent with the reported cDNA sequence as set forth in SEQ ID NO 44 It is preferred that an amplicon is produced using a CRW mRNA pool or a cDNA derived from such pool

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 44 from about nucleotide 130 through about nucleotide 440 was produced and cloned into a plasmid vector, and sufficient amounts of plasmid DNA were recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA was produced and a sample subjected to bioassay one RNA segment the sense strand, consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 44 from about nucleotide position 130 at least through about nucleotide position 440 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 44 and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand, being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 44 from about nucleotide position 440 at least through about nucleotide position 110, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) was treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA were overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae were allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 44 exhibited significant growth inhibition and mortality compared to controls

A Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase Homologous Sequence

Insect juvenile hormone controls and regulates a variety of necessary biological processes within the insect life cycle including but not necessarily limited to metamorphosis, reproduction, and diapause Juvenile hormone (JH) concentrations are required to peak at appropriate times within the haemolymph of the larval form of an insect pest, in particular lepidopteran and coleopteran larvae, and then must be degraded in order to terminate the effects of the hormone response Enzymes involved in decreasing the concentration of juvenile hormone are effective through two primary pathways of metabolic degradation One pathway involves juvenile hormone esterse (JHE), which hydrolyzes the methyl ester providing the corresponding acid The second pathway utilizes juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH) to achieve hydrolysis of the epoxide, resulting in formation of the diol The contribution of JHE in the degradation of JH is well understood and has been found to be invariate between the lepidoptera and coleoptera species Inhibition of JH esterase has been associated

with severe morphological changes including but not limited to larval wandering deferred pupation, and development of malformed intermediates In contrast the contribution of JHEH in JH metabolism is less well understood and had been shown to vary between the species, but recent studies point to evidence that suggests that JHEH may be the primary route of metabolism of JH (Brandon I Fetteroll, Doctoral Dissertation, North Carolina State University (Feb 10 2002) Synthesis and Analysis of Mechanism Based Inhibitors of Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase from Insect *Trichoplusia ni*) In any event disruption of either JH degradation pathway using gene suppression technology could be an effective target for double stranded RNA mediated pest inhibition

An insect juvenile hormone epoxide hydrolase homologous sequence derived from CRW was identified for use in the present invention SEQ ID NO 48 corresponds substantially to a CRW midgut cDNA nucleotide sequence An amino acid sequence translation of SEQ ID NO 48 predicted homology to a juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH) in *Manduca Sexta* (GenBank Accession No U46682) SEQ ID NO 49 and SEQ ID NO 50 correspond respectively to forward and reverse amplification primers (i e a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA, CRW mRNA pools or a CRW cDNA derived from such pools The sequence of such an amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene encoding a JHEH homologous protein SEQ ID NO 49 and SEQ ID NO 50 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-42 as set forth in SEQ ID NO 49 correspond to nucleotides 7-26 as set forth in SEQ ID NO 48 Nucleotides 24-44 as set forth in SEQ ID NO 50 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 48 from nucleotides 360-380 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 49 and SEQ ID NO 50 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template, a 95 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 52 was produced The amplicon sequence did not correspond to the cDNA sequence as set forth in SEQ ID NO 48 Preferably an amplicon is produced using a CRW mRNA pool or a cDNA derived from such pool as the template nucleotide sequence in the amplification reaction

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 48 is cloned into a plasmid vector, and sufficient amounts of plasmid DNA are recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA is produced and a sample is subjected to bioassay one RNA segment, the sense strand, consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 48 from about nucleotide position 7 at least through about nucleotide position 380 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 48 and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand, being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 48 from about nucleotide position 380 at least through about nucleotide position 7, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) is treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA are overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae are allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 48 exhibit significant growth inhibition and mortality compared to controls

A Swelling dependent chloride channel protein homologous sequence

Swelling dependent chloride channel proteins have been postulated to play a critical role in osmoregulation in eukaryotic animal cell systems Therefore, a nucleotide sequence exhibiting the ability to express an amino acid sequence that exhibits homology to previously identified swelling dependent chloride channel proteins may be a useful target for RNA inhibition in a pest

A swelling dependent chloride channel (SDCC) amino acid sequence homolog was deduced from a CRW cDNA library and used in the present invention SEQ ID NO 53 corresponds substantially to a CRW midgut cDNA nucleotide sequence The amino acid sequence translation of SEQ ID NO 53 was determined to be homologous to a SDCC protein in the zebra fish *Danio rerio* (GenBank Accession No Y08484) SEQ ID NO 54 and SEQ ID NO 55SEQ ID NO 55 correspond respectively to forward and reverse thermal amplification primers (i e , a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA, from CRW mRNA pools, or from cDNA derived from such pools The sequence of such an amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene encoding a SDCC homologous protein SEQ ID NO 54 and SEQ ID NO 55 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-43 as set forth in SEQ ID NO 54 correspond to nucleotides 78-97 as set forth in SEQ ID NO 53 Nucleotides 24-41 as set forth in SEQ ID NO 55 SEQ ID NO 55 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 53 from nucleotides 332-349 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 54 and SEQ ID NO 55 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template a 318 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 56 is produced, corresponding substantially to a part of the CRW genome encoding a protein exhibiting substantial identity to a SDCC protein The nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 56 from about nucleotide 24 through about nucleotide 295 corresponds substantially to the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO 53 from nucleotides 78-349

The amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 56 is cloned into a plasmid vector, and sufficient amounts of plasmid DNA are recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA is produced and a sample subjected to bioassay, one RNA segment, the sense strand, consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 56 from about nucleotide position 24 at least through about nucleotide position 295 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 56 and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 56 from about nucleotide position 295 at least through about nucleotide position 24, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) is treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA are overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 56 exhibit significant growth inhibition and mortality compared to controls

A Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase protein homologous sequence

Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase protein (G6PD) catalyzes the oxidation of glucose-6-phosphate to 6-phosphogluconate while concomitantly reducing the oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP+) to NADPH NADPH is known in the art as a required cofactor in many eukaryotic

biosynthetic reactions, and is known to maintain glutathione in its reduced form Reduced glutathione acts as a scavenger for dangerous oxidative metabolites in eukaryotic cells, and with the assistance of the enzyme glutathione peroxidase convert harmful hydrogen peroxide to water (Beutler et al , 1991 N Engl J Med 324 169-174) Therefore, G6PD may be a preferable target for double stranded RNA mediated inhibition in an invertebrate pest

A glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase protein (G6PD) homologous amino acid sequence was deduced from a CRW cDNA library and used in the present invention SEQ ID NO 57 corresponds substantially to a CRW midgut cDNA nucleotide sequence The amino acid sequence translation of SEQ ID NO 57 was determined to exhibit homology to a G6PD protein in a ray-finned fish species (GenBank Accession No U72484) SEQ ID NO 58 and SEQ ID NO 59 correspond respectively to forward and reverse genome amplification primers (i e a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA, from CRW mRNA pools, or from cDNA derived from such pools The sequence of such an amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene encoding a G6PD homologous protein SEQ ID NO 58 and SEQ ID NO 59 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-46 as set forth in SEQ ID NO 58 correspond to nucleotides 113-136 as set forth in SEQ ID NO 57 Nucleotides 24-45 as set forth in SEQ ID NO 59 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 57 from nucleotides 373-394 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 58 and SEQ ID NO 59 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template, a 328 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 60 is produced, corresponding substantially to a part of the CRW genome encoding a protein exhibiting homology to a G6PD protein The nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 60 from about nucleotide 24 through about nucleotide 305 corresponds substantially to the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO 57 from nucleotides 113-394

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 60 is cloned into a plasmid vector and sufficient amounts of plasmid DNA are recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent 17 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA is produced and a sample subjected to bioassay one RNA segment, the sense strand, consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 60 from about nucleotide position 24 at least through about nucleotide position 305 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 60 and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 60 from about nucleotide position 305 at least through about nucleotide position 24 uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) is treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA are overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 60 exhibit significant growth inhibition and mortality compared to controls

An Act42A protein homologous sequence

Actin is a ubiquitous and highly conserved eukaryotic protein required for cell motility and locomotion (Lovato et al , 2001, Insect Mol Biol 20 333-340) A number of CRW cDNA sequences were identified that

were predicted to likely encode actin or proteins exhibiting amino acid sequence structure related to actin proteins Therefore, genes encoding actin homologues in a pest cell may be useful targets for double stranded RNA mediated inhibition

One UNIGENE cluster identified within a corn rootworm midgut cDNA library (Cluster 156_1) consisted of several singleton EST sequences that were each predicted to encode all or part of actin homologous proteins Upon alignment of these singletons into the cluster a consensus sequence was derived as set forth in SEQ ID NO 61 that was predicted to encode an actin protein homolog Homologous actin protein sequences within the annotation group included but were not limited to *Drosophila melanogaster* actin 3 fragments a *Helicoverpa armigera* cytoplasmin actin A3a (GenBank Accession No X97614), a *Drosophila melanogaster* actin (GenBank Accession No X06383), a hemichordate *Saccoglossus kowalevskii* actin messenger RNA sequence, and a *Strongylocentrotus purpuratus* actin (GenBank Accession No X05739)

SEQ ID NO 62 and SEQ ID NO 63 correspond respectively to forward and reverse genome amplification primers (i e , a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA, CRW mRNA pools, or from a cDNA derived from such pools The sequence of such an amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene encoding an actin homologous protein SEQ ID NO 62 and SEQ ID NO 63 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-45 as set forth in SEQ ID NO 62 correspond to nucleotides 14-35 as set forth in SEQ ID NO 61 Nucleotides 24-45 as set forth in SEQ ID NO 63 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 61 from nucleotides 449-470 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 62 and SEQ ID NO 63 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template, a 503 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 64 is produced, corresponding substantially to a part of the CRW genome encoding a protein exhibiting homology to an actin protein The nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 64 from about nucleotide 24 through about nucleotide 480 corresponds substantially to the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO 61 from nucleotides 14-470

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 64 is cloned into a plasmid vector, and sufficient amounts of plasmid DNA recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA is produced and a sample subjected to bioassay one RNA segment the sense strand consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 64 from about nucleotide position 24 at least through about nucleotide position 480 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 64 and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand, being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 64 from about nucleotide position 480 at least through about nucleotide position 24, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) is treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA s (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA are overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 64 exhibit significant growth inhibition and mortality compared to controls

A ADP-ribosylation factor 1 homologous sequence

ADP ribosylation factors have been demonstrated to be essential in cell function in that they play integral roles in the processes of DNA damage repair, carcinogenesis, cell death, and genomic stability Thus, it would be useful to be able to selectively disrupt transcription of ADP-ribosylation factors in invertebrate pest species using double stranded RNA mediated inhibition

A number of CRW cDNA sequences were identified that were predicted to encode amino acid sequences exhibiting homology to ADP-ribosylation factor proteins One UNIGENE cluster in particular (Cluster 88_1) was composed of about thirty (30) EST singletons that were each predicted to encode all or part of actin homologous proteins Upon alignment of these singletons into the cluster, a consensus sequence was derived as set forth in SEQ ID NO 65 An amino acid sequence translation of the singleton CRW cDNA sequence comprising this cluster predicted an amino acid sequence exhibiting homology to ADP-ribosylation factor homologs ADP-ribosylation factor protein sequences exhibiting significant homology to the deduced amino acid sequence from the ORF within SEQ ID NO 65 included but were not limited to a *Drosophila melanogaster* ADP-ribosylation factor (GenBank Accession No Y10618), a *Drosophila obscura* ADP-ribosylation factor (GenBank Accession No AF025798), a *Anopheles gambiae* ADP-ribosylation factor (GenBank Accession No L11617), and a Australian sheep blowfly (*Lucilia cuprina*) ADP-ribosylation factor (GenBank Accession No AF218587)

SEQ ID NO 66 and SEQ ID NO 67 correspond respectively to forward and reverse amplification primers (i e , a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA CRW mRNA pools, or from cDNA sequences derived from such pools The sequence of such an amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene encoding an ADP-ribosylation factor homologous protein SEQ ID NO 66 and SEQ ID NO 67 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-42 as set forth in SEQ ID NO 66 correspond to nucleotides 70-88 as set forth in SEQ ID NO 65 Nucleotides 24-40 as set forth in SEQ ID NO 67 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 65 from nucleotides 352-368 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 66 and SEQ ID NO 67 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template, a 345 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 68 is produced, corresponding substantially to a part of the CRW genome encoding a protein exhibiting homology to an ADP-ribosylation factor protein The nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 68 from about nucleotide 24 through about nucleotide 322 corresponds substantially to the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO 65 from nucleotides 70-368

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 68 is cloned into a plasmid vector, and sufficient amounts of plasmid DNA recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA is produced and a sample subjected to bioassay, one RNA segment, the sense strand, consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 68 from about nucleotide position 24 at least through about nucleotide position 322 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 68 and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand, being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 68 from about nucleotide position 322 at least through about nucleotide position 24, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) is treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA are overlayed

onto CRW diet bioassay as described above and larvae allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 68 exhibit significant growth inhibition and mortality compared to controls

A Transcription Factor IIB protein homologous sequence

Transcription elongation and transcription termination factors, as indicated above, are essential to metabolism and may be advantageous targets for double stranded RNA mediated inhibition to control or eliminate invertebrate pest infestation

A CRW cDNA sequence was identified that was predicted to encode an amino acid sequence exhibiting homology to a transcription factor IIB protein SEQ ID NO 69 served as the basis for constructing a primer pair for use in amplifying a sequence from within the CRW genome encoding the mRNA that formed the basis for this cDNA sequence

SEQ ID NO 70 and SEQ ID NO 71 correspond respectively to forward and reverse thermal amplification primers (i e , a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA, from CRW mRNA pools, or from cDNA derived from such pools The sequence of such an amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene encoding a transcription factor IIB homologous protein SEQ ID NO 70 and SEQ ID NO 71 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-44 as set forth in SEQ ID NO 70 correspond to nucleotides 4-24 as set forth in SEQ ID NO 69 Nucleotides 24-44 as set forth in SEQ ID NO 71 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 69 from nucleotides 409-429 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 70 and SEQ ID NO 71 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template, a 472 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 72 is produced, corresponding substantially to a part of the CRW genome encoding a protein exhibiting homology to a transcription factor IIB protein The nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 72 from about nucleotide 24 through about nucleotide 449 corresponds substantially to the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO 69 from nucleotides 4-429

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 72 is cloned into a plasmid vector, and sufficient amounts of plasmid DNA recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA is produced and a sample subjected to bioassay, one RNA segment, the sense strand, consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 72 from about nucleotide position 24 at least through about nucleotide position 449 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 72 and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 72 from about nucleotide position 449 at least through about nucleotide position 24, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) is treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA are overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 72 exhibit significant growth inhibition and mortality compared to controls

Chitinase homologous sequences

Chitin is a β(1→ 4)homopolymer of N-acetylglucosamine and is found in insect exoskeletons Chitin is formed from UDP-N-acetlglucosamine in a reaction catalyzed by chitin synthase Chitin is a structural homopolymer polysaccharide and there are many enzymatic steps involved in the construction of this highly branched and cross-linked structure Chitin gives shape, rigidity and support to insects and provides a scaffolding to which internal organs such as muscles are attached Chitin must also be degraded to some extent to mediate the steps involved in the insect molting process Therefore it is believed that double stranded RNA mediated inhibition of proteins in these pathways would be useful as a means for controlling invertebrate pest infestation

Amino acid sequence information was identified from translation of corn rootworm midgut cDNA library sequences that exhibited homology to chitinase proteins One chitinase consensus sequence (UNIGENE Cluster No 716_1 SEQ ID NO 73) was generated from the alignment of two singleton EST sequences A second chitinase consensus sequence (UNIGENE Cluster No 1238_1, SEQ ID NO 77) was generated from the alignment of four singleton sequences Amino acid sequence translations derived from ORF's within these UNIGENE s were annotated to a mustard beetle (*Phaedon cochleariae*) chitinase amino acid sequence (GenBank Accession No Y18011) SEQ ID NO 73 and SEQ ID NO 77 served as the basis for constructing primer pairs for use in amplifying two sequences from within the CRW genome, from CRW mRNA pools or from cDNA sequences derived from such mRNA pools The nucleotide sequence of such amplicons should correspond to all or a part of a gene encoding a chitinase homologous protein

SEQ ID NO 74 and SEQ ID NO 75 correspond respectively to forward and reverse thermal amplification primers (i e , a primer pair) for use in producing an amplicon from nucleotide sequences derived from a corn rootworm The sequence of such an amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene as set forth in SEQ ID NO 73 encoding a chitinase homologous protein SEQ ID NO 74 and SEQ ID NO 75 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-42 as set forth in SEQ ID NO 74 correspond to nucleotides 1-19 as set forth in SEQ ID NO 73 Nucleotides 24-47 as set forth in SEQ ID NO 75 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 73 from nucleotides 470-493 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 74 and SEQ ID NO 75 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template a 472 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 76 is produced corresponding substantially to a part of the CRW genome encoding a protein exhibiting homology to a chitinase protein The nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 76 from about nucleotide 24 through about nucleotide 516 corresponds substantially to the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO 76 from nucleotides 1-493

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 76 is cloned into a plasmid vector and sufficient amounts of plasmid DNA recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA is produced and a sample subjected to bioassay one RNA segment, the sense strand consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 76 from about nucleotide position 24 at least through about nucleotide position 516 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 76, and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand, being substantially the reverse

complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 76, from about nucleotide position 516 at least through about nucleotide position 24, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) is treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA are overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 76 exhibit significant growth inhibition and mortality compared to controls

SEQ ID NO 78 and SEQ ID NO 79 correspond respectively to forward and reverse genome amplification primers (i e , a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA, CRW mRNA pools, or from cDNA sequences derived from such mRNA pools The sequence of such an amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene as set forth in SEQ ID NO 77 encoding a chitinase homologous protein SEQ ID NO 78 and SEQ ID NO 79 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-44 as set forth in SEQ ID NO 78 correspond to nucleotides 64-84 as set forth in SEQ ID NO 77 Nucleotides 24-44 as set forth in SEQ ID NO 79 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 77 from nucleotides 779-799 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 78 and SEQ ID NO 79 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template a 912 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 80 was produced An alignment of the cDNA sequence as set forth in SEQ ID NO 77 and the amplicon sequence revealed that there was substantial dissimilarity between the two sequences, resulting only in an about 32% sequence identity Preferably an amplicon is produced using primer pairs such as these as set forth at SEQ ID NO 's 78 and 79 and mRNA or cDNA as template in order to avoid such inconsistencies

An amplicon exhibiting the sequence corresponding substantially to SEQ ID NO 77 is cloned into a plasmid vector and sufficient amounts of plasmid DNA are recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA is produced and a sample is subjected to bioassay, one RNA segment, the sense strand, consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 77 from about nucleotide position 64 at least through about nucleotide position 799 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 77 and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand, being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 77, from about nucleotide position 799 at least through about nucleotide position 64, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) is treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA s (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA are overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae are allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to allor a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 77 exhibit significant growth inhibition and mortality compared to controls

A Ubiquitin conjugating enzyme homologous sequence

The ubiquitin pathway plays an important role in the control of the cell cycle by the specific degradation of a number of regulatory proteins including mitotic cyclins and inhibitors of cyclin-dependent kinases such as p27 of mammalian cells Thus, genes encoding ubiquitin and associated components may be a

preferred target for double stranded RNA mediated inhibition (Smith et al , Plant Phys 1997, 113 281-291) The ubiquitin-dependent proteolytic pathway is one of the major routes by which intracellular proteins are selectively destroyed in eukaryotes Conjugation of ubiquitin to substrate proteins is mediated by a remarkably diverse array of enzymes Proteolytic targeting may also be regulated at steps between ubiquitination of the substrate and its degradation to peptides by the multi-subunit 26S protease The complexity of the ubiquitin system suggests a central role for protein turnover in eukaryotic cell regulation, and implicates other proteins in the pathway including ubiquitin-activating enzyme, ubiquitin-conjugating enzyme, ubiquitin-protein ligase, and 26S proteasome subunit components Therefore, it is believed that double stranded RNA mediated inhibition of proteins in this pathway would be useful as a means for controlling invertebrate pest infestation

A CRW cDNA library sequence was identified that was predicted to encode an amino acid sequence exhibiting homology to a ubiquitin conjugating enzyme SEQ ID NO 81 served as the basis for constructing a primer pair for use in producing an amplicon comprising all or a part of a ubiquitin conjugating enzyme from corn rootworm

SEQ ID NO 82 and SEQ ID NO 83 correspond respectively to forward and reverse genome amplification primers (i e , a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA, from CRW mRNA pools, or from a cDNA derived from such mRNA pools The sequence of such amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene encoding a ubiquitin conjugating enzyme homologous protein SEQ ID NO 82 and SEQ ID NO 83 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-42 as set forth in SEQ ID NO 82 correspond to nucleotides 16-34 as set forth in SEQ ID NO 81 Nucleotides 24-42 as set forth in SEQ ID NO 83 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 81 from nucleotides 295-313 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 82 and SEQ ID NO 83 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template, a 344 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 84 is produced, corresponding substantially to a part of the CRW genome encoding a protein exhibiting homology to a ubiquitin conjugating enzyme The nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 84 from about nucleotide 24 through about nucleotide 321 corresponds substantially to the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO 81 from nucleotides 16-313

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 84 is cloned into a plasmid vector, and sufficient amounts of plasmid DNA are recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA is produced and a sample subjected to bioassay, one RNA segment, the sense strand, consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 84 from about nucleotide position 24 at least through about nucleotide position 253 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 84, and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 84 from about nucleotide position 253 at least through about nucleotide position 24, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) is treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA s (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA are overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet

containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth in SEQ ID NO 84 exhibit significant growth inhibition and mortality compared to controls

A Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologous sequence

The glycolytic pathway is an essential pathway in most organisms and is involved in the production of metabolic energy from the degradation of glucose One important enzyme in the second stage of the glycolytic pathway is glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) which, in the presence of NAD+ and inorganic phosphate, catalyzes the oxidation of 3-phospho-glyceraldehyde to 3-phosphoglyceroyl-phosphate along with the formation of NADH The important component of this reaction is the storage of energy through the formation of NADH Genes encoding enzymes associated with the glycolytic pathway, and particularly genes encoding enzymes involved in the steps useful in formation of energy reserves may be particularly useful targets for double stranded RNA mediated inhibition in invertebrate pest species

A CRW cDNA library sequence was identified that was predicted to encode an amino acid sequence exhibiting homology to a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) protein The consensus sequence for the cluster set forth at SEQ ID NO 85 was assembled from the overlapping sequences of three singleton ESI sequences An amino acid sequence translation of an ORF within thenucleotide sequence SEQ ID NO 85 exhibited homology with a G3PDH amino acid sequence derived from a *Crytococcus curvatus* G3PDH gene (GenBank Accession No AF126158) and with a G3PDH protein amino acid sequence from the organism *Drosophila pseudoobscura* (GenBank Accession No AF025809) Thus, an amino acid sequence translation of the sequence as set forth at SEQ ID NO 85 was predicted to be a part of a CRW G3PDH enzyme protein The nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO 85 served as the basis for constructing a thermal amplification primer pair for use in amplifying a sequence encoding a CRW G3PDH enzyme sequence

SEQ ID NO 86 and SEQ ID NO 87 correspond respectively to forward and reverse thermal amplification primers (i e , a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW nucleotide sequences, either genome DNA mRNA pools, or from cDNA sequences derived from such mRNA pools The sequence of such an amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene encoding a G3PDH homologous protein SEQ ID NO 86 and SEQ ID NO 87 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-45 as set forth in SEQ ID NO 86 correspond to nucleotides 103-124 as set forth in SEQ ID NO 85 Nucleotides 24-45 as set forth in SEQ ID NO 87 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 85 from nucleotides 573-594 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 86 and SEQ ID NO 87 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template a 538 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 88 is produced, corresponding substantially to a part of the CRW genome encoding a protein exhibiting homology to a ubiquitin conjugating enzyme The nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 88 from about nucleotide 24 through about nucleotide 515 corresponds substantially to the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO 85 from nucleotides 103-594

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 88 is cloned into a plasmid vector and sufficient amounts of plasmid DNA are recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA is produced and a sample subjected to bioassay, one RNA segment, the sense strand, consisting of the sequence as

set forth in SEQ ID NO 88 from about nucleotide position 24 at least through about nucleotide position 515 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 88 and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand, being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 88 from about nucleotide position 515 at least through about nucleotide position 24, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) is treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA are overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 88 exhibit significant growth inhibition and mortality compared to controls

A Ubiquitin B homologous sequence

As described above, the ubiquitin protein degradation pathway plays an important role in the control of the cell cycle by the specific degradation of a number of regulatory proteins including mitotic cyclins and inhibitors of cyclin-dependent kinases such as p27 of mammalian cells Thus, genes encoding ubiquitin and associated components may be a preferred target for double stranded RNA mediated inhibition (Smith et al , Plant Phys 1997 113 281-291)

A CRW cDNA library sequence was identified that was predicted to encode an amino acid sequence exhibiting homology to a protein designated herein as ubiquitin B The consensus sequence for the UNIGENE cluster set forth at SEQ ID NO 89 was assembled from the overlapping sequences of four singleton EST sequences An amino acid sequence translation of SEQ ID NO 89 exhibited homology with a polyubiquitin amino acid sequence from *Amoeba proteus* (GenBank Accession No AF034789) and with a ubiquitin protein sequence from *Drosophila melanogaster* (GenBank Accession No M22428) Thus, an amino acid sequence translation of the sequence as set forth at SEQ ID NO 89 was believed to encode a ubiquitin B SEQ ID NO 89 served as the basis for constructing a primer pair for use in a thermal amplification reaction to amplify a nucleotide sequence encoding all or a part of a corn rootworm ubiquitin B amino acid sequence

SEQ ID NO 90 and SEQ ID NO 91 correspond respectively to forward and reverse thermal amplification primers (i e a primer pair) for use in producing an amplicon from nucleotide sequences derived from CRW, either genomic DNA mRNA pools, or cDNA derived from such mRNA pools The sequence of such an amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene encoding a ubiquitin B homologous protein SEQ ID NO 90 and SEQ ID NO 91 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-40 as set forth in SEQ ID NO 90 correspond to nucleotides 62-78 as set forth in SEQ ID NO 89 Nucleotides 24-47 as set forth in SEQ ID NO 91 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 89 from nucleotides 399-422 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 90 and SEQ ID NO 91 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template a 407 base pair amplicon comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 92 is produced, corresponding substantially to a part of the CRW genome encoding a protein exhibiting homology to a ubiquitin conjugating enzyme The nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 92 from about nucleotide 24 through about nucleotide 384 corresponds substantially to the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO 89 from nucleotides 62-422

The amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 92 is cloned into a plasmid vector and sufficient amounts of plasmid DNA recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA is produced and a sample subjected to bioassay one RNA segment, the sense strand, consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 92 from about nucleotide position 24 at least through about nucleotide position 384 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 92, and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand, being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 92 from about nucleotide position 384 at least through about nucleotide position 24, uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) is treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA are overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 92 exhibit significant growth inhibition and mortality compared to controls

A juvenile hormone esterase homolog

As indicated above insect juvenile hormone controls and regulates a variety of necessary biological processes within the insect life cycle including but not necessarily limited to metamorphosis reproduction, and diapause Disruption of JH synthesis or degradation pathways using gene suppression technology could be an effective target for double stranded RNA mediated pest inhibition

An insect juvenile hormone esterase homologous sequence derived from CRW was identified for use in the present invention SEQ ID NO 93 corresponds substantially to a CRW midgut cDNA nucleotide sequence An amino acid sequence translation of SEQ ID NO 93 predicted homology to a juvenile hormone esterase (JHE) SEQ ID NO 94 and SEQ ID NO 95 correspond respectively to forward and reverse amplification primers (i e , a primer pair) for use in producing an amplicon from CRW genomic DNA CRW mRNA pools, or a CRW cDNA derived from such pools The sequence of such an amplicon should correspond to all or a part of a CRW gene encoding a JHE homologous protein SEQ ID NO 94 and SEQ ID NO 95 each contain a 23 nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1-23 respectively Nucleotides 24-45 as set forth in SEQ ID NO 94 correspond to nucleotides 58-79 as set forth in SEQ ID NO 93 Nucleotides 24-46 as set forth in SEQ ID NO 95 correspond to the reverse complement of the sequence as set forth in SEQ ID NO 93 from nucleotides 338-360 Using the primer pair consisting of SEQ ID NO 94 and SEQ ID NO 95 in an amplification reaction with CRW genomic DNA as a template a 348 base pair amplicon was produced comprising the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 170 Preferably, an amplicon is produced using a CRW mRNA pool or a cDNA derived from such pool as the template nucleotide sequence in the amplification reaction

An amplicon exhibiting the sequence corresponding to SEQ ID NO 170 is cloned into a plasmid vector and sufficient amounts of plasmid DNA are recovered to allow for in vitro T7 RNA polymerase transcription from the embedded convergent T7 promoters at either end of the cloned amplicon Double stranded RNA is produced and a sample is subjected to bioassay one RNA segment, the sense strand, consisting of the sequence as set forth in SEQ ID NO 170 from about nucleotide position 45 at least through about

nucleotide position 302 except that a uridine residue is present at each position in which a thymidine residue is shown in SEQ ID NO 96, and the reverse complement RNA segment, or the anti-sense strand, being substantially the reverse complement of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 170 from about nucleotide position 302 at least through about nucleotide position 45 uridines appropriately positioned in place of thymidines A sample of double stranded RNA (dsRNA) is treated with DICER or with RNAse III to produce sufficient quantities of small interfering RNA's (siRNA) Samples containing 0 15 parts per million siRNA or dsRNA are overlayed onto CRW diet bioassay as described above and larvae are allowed to feed for 13 days CRW larvae feeding on diet containing dsRNA corresponding to all or a part of the sequence as set forth at SEQ ID NO 170 exhibit significant growth inhibition and mortality compared to controls

Ten of the double stranded RNA molecules listed above were tested in bioassay in parallel with small interfering RNA's generated from the double stranded RNA molecules Double stranded RNA sequence samples or small interfering RNA samples prepared from the double stranded RNA sequence samples, each corresponding to amino acid sequences annotated to selected target gene homologs including a 40 kDa V-ATPase homolog, an EF-1-alpha homolog, a 26S proteasome subunit p28 homolog, a juvenile hormone epoxide hydrolase homolog, a CHD3 homolog, a beta-tubulin homolog, two chitinase homologs, a transcription factor IIB homolog, and a juvenile hormone esterase homolog (corresponding respectively to SEQ ID NO 35 SEQ ID NO 39 SEQ ID NO 47 SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 76, SEQ ID NO 80, SEQ ID NO 72, and SEQ ID NO 96) were applied to the insect diet at a concentration of about ten parts per million (30 microliters of solution containing a double stranded RNA sample adjusted to an appropriate concentration was added to microtiter dish wells containing 200 microliters insect diet per well) A total of eighteen wells were used for each sample A single first instar larva was added to each well after the RNA samples had diffused into the diet The bioassays were incubated as indicated above for about 13 days and monitored daily for morbidity and mortality An amino acid sequence variant Cry3Bb1 insecticidal crystal protein designated as insecticidal protein 11231 in English et al (US Patent No 6,642,030) was used as a positive control for observing insecticidal bioactivity specific for the rootworm pest Cry3Bb was applied to the diet as set forth in English et al , except that the concentration of Cry3Bb in the diet was adjusted to be about 200-300 parts per million A separate control sample that was treated only with buffer or water was also included in the assay A double stranded RNA control sample and a small interfering RNA control sample produced from double stranded RNA control samples were also included as additional negative controls (MEGAscript® RNAi Kit, AMBION Austin Texas)

An initial evaluation using double stranded RNA molecules derived from these ten sequences indicated that larvae which were allowed to feed on diet containing double stranded RNA corresponding to a 40 kDa V-ATPase homolog (SEQ ID NO 35) a CHD3 homolog (SEQ ID NO 7), and a beta-tubulin homolog (SEQ ID NO 31) exhibited significant mortality in comparison to the controls Based on these results, additional bioassays were conducted to test whether small interfering double stranded RNA particles would be more effective than the full length double stranded RNA molecules

A alpha tubulin homologous sequence

Eukaryotic cells generally utilize cytoskeletal structural elements that are important, no t only as a mechanical scaffold, but also in sustaining the shape of the cell Semiflexible microfilaments make cells

mobile help them to divide in mitosis (cytokinesis) and, in vertebrate and invertebrate animals are responsible for muscular contraction The relatively stiff microtubules which are made up of alpha and beta tubulin proteins play an important role in acting as a sort of highway for transport of vesicles and organelles and in the separation of chromosomes during mitosis (karyokinesis) The flexible intermediate filaments provide at least additional strength to the overall cellular structure The cytoskeleton is also known to be involved in signaling across the cell cytoplasm Taking these functions into account, it is believed that any disruption of the cytoskeleton or even subtle changes of its integrity may cause pathological consequences to a cell

At least one CRW cDNA library sequence was identified that was predicted to encode an amino acid sequence exhibiting homology to a protein designated herein as alpha tubulin and more specifically referred to herein as SEQ ID NO 163 as set forth in the sequence listing An amino acid sequence translation of the sequence as set forth at SEQ ID NO 163 was believed to encode an alpha tubulin protein or fragment thereof SEQ ID NO 163 served as the basis for constructing a sequence that is predicted to form a double stranded RNA when expressed in *E coli* from a T7 promoter or in a plant from a plant functional promoter A sequence serving as the basis for such double stranded RNA coding sequence is SEQ ID NO 97 as set forth in the sequence listing from nucleotide position 58 through nucleotide position 1010 This sequence can be expressed as a RNA molecule and purified and tested in vitro feeding assays for determining corn rootworm inhibition

A 17 RNA polymerase promoter was introduced upstream of a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 97 from nucleotide position 58 through nucleotide position 1010, and RNA was produced from this construct (pIC17527) Such RNA was tested in triplicate in an in vitro feeding assay against corn rootworms against a beta tubulin positive control (described hereinabove), 200 ppm Cry3Bb, and an untreated control, and mean mortality was determined Untreated control samples exhibited less than about 3-5 % mortality, while all other test samples exhibited from about 20 to about 55% mortality Cry3Bb samples exhibited from about 20 to about 36% mortality while the pIC17527 samples (at 15 ppm) exhibited from about 38 to about 45% mortality The D8 (beta tubulin as set forth herein above) samples also at about 15 ppm exhibited from about 38 to about 52% mortality Based on these results, the alpha tubulin construct was placed under the control of a plant functional promoter used to transform corn plants and transformation events arising from the transformation were tested for their ability to resist corn rootworm infestation

Roots from R0 corn plants transformed with a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 97 Briefly, the sequence encoding a dsRNA construct in SEQ ID NO 97 as described above was linked at the 5' end to a sequence that consisted of an e35S promoter operably linked to a maize hsp70 intron and at the 3' end to a NOS3' transcription termination and polyadenylation sequence This expression cassette was placed downstream of a glyphosate selection cassette These linked cassettes were then placed into an *Agrobacterium tumefaciens* plant transformation functional vector and the new vector was designated as pMON72829 (the alpha tubulin dsRNA construct), used to transform maize tissue to glyphosate tolerance, and events were selected and transferred to soil R0 plant roots were fed to western corn rootworm larvae (WCR *Diabrotica virgifera)* Transgenic corn roots were handed-off in Petri dishes with MS0D medium containing the antibiotics and glyphosate for *in vitro* selection Two WCR larvae were infested per root in each dish with a fine tip paintbrush The dishes were sealed with Parafilm to prevent the larvae from escaping The assays were placed into a 27° C 60% RH Percival incubator in complete darkness Contamination and larval quality were monitored After six days of feeding on root tissue the larvae were transferred to WCR diet in a 96 well plate

The larvae were allowed to feed on the diet for eight days making the full assay fourteen days long Larval mass and survivorship were recorded for analysis A one-way analysis was performed on the larval mass data and a Dunnett's test to look for statistical significance compared to LH244, an untransformed negative control WCR larvae were significantly stunted ($\alpha = 0\ 05$) after feeding on two events, ZM_S125922 and ZM_S125938 and compared to growth of larvae fed on negative control plants ($p<0\ 02$) Larvae feeding on negative control plants exhibited a mean larval mass of from about 0 6 to about 0 8 mg while larvae feeding on the transgenic roots exhibited a mean larval mass of from about 0 1 to about 0 2 mg

Transgenic corn plants (R0) generated using pMON72829 were planted into 10-inch pots containing Metromix soil after reaching an appropriate size When plants reached the V4 growth stage, approximately 1000 Western corn rootworm (WCR, *Diabrotica virifera*) eggs were infested into the root zone Non-transgenic corn of the same genotype was infested at a similar growth stage to serve as a negative control Eggs were pre-incubated so hatch would occur within 24 hours of infestation Larvae were allowed to feed on the root systems for 3 weeks Plants were removed from the soil and washed so that the roots could be evaluated for larval feeding Root damage was rated using a Node Injury Scale (NIS) was used to score the level of damage where a 0 indicates no damage, a 1 indicates that one node of roots was pruned to within 1 5 inches, a 2 indicates that 2 nodes were pruned, while a 3 indicates that 3 nodes were pruned Because the plants being used for evaluation were directly out of tissue culture after transformation and because transformation events are unique, only a single plant was evaluated per event at this time and no statistics are available All plants in the assay presented symptoms of larval feeding indicating that a successful infestation was obtained Negative control plant roots were moderately to severely damaged averaging about 1 9 on the Node Injury Scale Single plants from eight different transgenic events were tested Roots of three of these transgenic plants provided excellent control of larval feeding averaging about 0 2 or less on the Node Injury Scale Roots from two of the transgenic plants exhibited moderate feeding damage, and three other transgenic plants exhibited no control of larval feeding This data indicated that the double nucleotide sequence encoding a RNA sequence that can form into a dsRNA is fully capable of providing protection from rootworm pest infestation when expressed in a transgenic plant and that plant is provided in the diet of the rootworm pest

One explanation for the lack of consistent observable mortality or other effects with the sequences selected for gene suppression including EF1alpha 26S proteasome subunit, and various other cDNA sequences could be that for these genes there are expressed homologues present within the population of genes encoding proteins that have similar functions but exhibit sufficient sequence differences that the RNAi pathway does not act to suppress the homologue using the sequences selected for suppression

Example 2

This example illustrates significant pest inhibition obtained by feeding to an invertebrate pest a diet containing double stranded RNA sequences derived from that pest

Artificial diet sufficient for rearing corn rootworm larvae was prepared by applying samples of double stranded RNA sequences derived from six different corn rootworm cDNA library sequences Corn rootworm larvae were allowed to feed on the diet for several days and mortality, morbidity and stunting monitored in comparison to rootworms allowed to feed only on control diet The nucleotide sequences that were used in the

diet were derived from sequences as set forth in SEQ ID NO 35, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 7, and SEQ ID NO 31, each corresponding to nucleotide sequences derived from a corn rootworm cDNA library, the deduced amino acid sequence translation of which corresponds respectively to proteins annotated to a 40 kDa V-ATPase homolog an EF1α homolog, a 26S proteasome subunit homolog, a juvenile hormone epoxide hydroxylase homolog, a CHD3 homolog, and a β-tubulin homolog

Double stranded RNA's (dsRNA's) corresponding to these sequences were produced as indicated above siRNA s were generated by cleavage of the corresponding dsRNA's using RNAse III enzyme which is known to cleave dsRNA into 12-15 bp dsRNA fragments containing 2 to 3 nucleotide 3' overhangs and 5' phosphate and 3' hydroxyl termini The siRNA's produced in this fashion were expected to exhibit the same properties as siRNA's that would be produced by the Dicer enzyme involved in the eukaryotic RNAi pathway

The dsRNA's and siRNA's were sampled onto the CRW diet as indicated above at about 0 15 ppm 12 individual corn rootworm larvae were tested separately against each dsRNA or siRNA sample as indicated above and the results were scored after 13 days

A significant reduction in larval mass ($p<0.05$) was observed for larvae feeding on diet containing 0 15 ppm dsRNA sequences as set forth in SEQ ID NO 35 SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 7, and SEQ ID NO 31 compared to the untreated control (UTC) siRNA corresponding to sequences as set forth in SEQ ID NO 35 SEQ ID NO 39 SEQ ID NO 47, and SEQ ID NO 7 also provided a significant reduction in larval mass ($p<0.05$) However, the larval sample size was insufficient to establish with certainty that the dsRNA or siRNA molecules which resulted in the greatest decrease in larval mass compared to the controls was a result of random variation or clearly a result based on double stranded RNA mediated inhibition of some biological function within the rootworm larvae Therefore, based on these results, RNA sequences corresponding to SEQ ID NO 35 SEQ ID NO 39 SEQ ID NO 7 and SEQ ID NO 31 were re-evaluated with a larger larval sample size

dsRNA or siRNA samples were applied to each of 72 wells for each of the four RNA sequences in the evaluation Each well was loaded with 0 15 ppm dsRNA or siRNA as indicated above by applying a 30 microliter volume containing the RNA to the surface of the diet and allowing the sample to infuse and the surface of the diet to dry A single larva was added to each well and incubated for thirteen days Larval mortality and morbidity were evaluated, and mass of surviving larvae was determined The bioassay results are shown in Table 1

Table 1 Bioassay Results

RNA	% Mortality	Mass (mg)	STE
dsRNA Bioassay Results			
SEQ ID NO 35	62 25	0 42	0 12
SEQ ID NO 39	50 5	0 39	0 05
SEQ ID NO 7	47 67	0 37	0 05
SEQ ID NO 31	92 24	0 27	0 05
dsRNA Control[1]	21 08	0 58	0 08
Cry3Bb[2]	42 08	0 21	0 03
UTC	5 58	1 24	0 33
siRNA Bioassay Results			
SEQ ID NO 35	21 11	0 45	0 06
SEQ ID NO 35	21 39	1 31	0 16
SEQ ID NO 7	15 83	0 73	0 09
SEQ ID NO 31	20 00	0 39	0 07
siRNA Control[1]	6 52	1 10	0 16
Cry3Bb[2]	27 78	0 49	0 05
UTC	9 45	1 25	0 18

All siRNA samples at 0 15 ppm per well
UTC – 10 mM TrisHCl pH 7 5
STE – standard error
1- phage λ dsRNA EPICENTER TECHNOLOGIES Madison, Wisconsin in dsRNA bioassay MEGAscript® RNAi Kit, AMBION, Austin, Texas in siRNA bioassay
2- Cry3Bb variant 11231 at 300 ppm in dsRNA bioassay, 200 ppm in siRNA bioassay

All samples were compared to each other using Tukey's HSD method rather than to any single control Significant larval stunting was observed for each dsRNA or siRNA tested as judged by average mass reduction of surviving larvae compared to the untreated control More importantly, the double stranded small interfering RNA samples demonstrated an ability to cause mortality and morbidity (based on reduced larval mass) at a level that was at least as effective as the positive control sample Cry3Bb variant 11231 These results suggest that any double stranded RNA molecule derived from a messenger RNA sequence present in the cells of corn rootworm could be effective when provided to rootworms in their diet to inhibit rootworm pest infestation of a plant species

Example 3

This example illustrates nucleotide sequences for expression in a plant cell, and the effect of providing such nucleotide sequences in the diet of a corn rootworm

A CHD3 coding sequence derived from a corn rootworm cDNA library was used to construct a nucleotide sequence encoding a stabilized double stranded RNA A cDNA sequence as set forth in SEQ ID NO 171 encoding a part of an ortholog or a homolog of a CHD3 amino acid sequence was used to construct a primer pair for use in a thermal amplification reaction using corn rootworm genomic template DNA The primer pair as set forth at SEQ ID NO 5 and SEQ ID NO 6 enabled the amplification of a double stranded genome amplicon, one strand of which exhibited the sequence as set forth in SEQ ID NO 7 Three nucleotide sequence segments were produced from the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 7 A first nucleotide segment (SEQ ID NO 174) was produced using a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 7 as template in a thermal amplification reaction along with the thermal amplification primer pair exhibiting the sequences as set forth in SEQ ID NO 8 and SEQ ID NO 9 A second nucleotide segment (SEQ ID NO 13) was produced using a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 7 as template in a thermal amplification reaction along with the thermal amplification primer pair exhibiting the sequences as set forth in SEQ ID NO 11 and SEQ ID NO 12 A third nucleotide segment (SEQ ID NO 16) was produced using a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 7 as template in a thermal amplification reaction along with the thermal amplification primer pair exhibiting the sequences a set forth in SEQ ID NO 14 and SEQ ID NO 15 The 3' end of one of the strands the first segment is complementary to the 3' end of one of the strands of the second segment so that in a thermal amplification reaction containing both of these segments, these complementary ends hybridize and allow for the polymerase-mediated extension of both strands from their respective 3' ends The 3' end of the other strand of the second segment is complementary to the 3 end of one of the strands of the third segment, so that in a thermal amplification reaction containing both of these segments, these complementary ends hybridize and allow for the polymerase-mediated extension of both strands from their respective 3' ends In a thermal amplification reaction containing all three segments and their complementary sequences i e , the first the second and the third segment along with thermal amplification primer sequences as set forth in SEQ ID NO 8 and SEQ ID NO 15, a new sequence is produced as set forth in SEQ ID NO 17, that when placed under the control of a promoter that functions in plants, can produce an RNA nucleotide sequence substantially identical to the sequence as set forth in SEQ ID NO 17 except that uridine residues are present in place of thymidine residues This RNA nucleotide sequence can form into a stabilized RNA molecule by virtue of the reverse complementarity of the third segment to the first segment, in which the portion of SEQ ID NO 17 corresponding

to the third segment from about nucleotide position 303 to about nucleotide position 473 hybridizes to the portion of SEQ ID NO 17 corresponding to the first segment from about nucleotide position 1 through about nucleotide position 171, and the first and the third segments are linked by a second nucleotide sequence segment, which in this example is represented by the portion of SEQ ID NO 17 corresponding to the second segment from about nucleotide position 172 through about nucleotide position 302 Expression of a nucleotide sequence corresponding to SEQ ID NO 17 in plant cells results in the synthesis of a stabilized RNA molecule Plant cells transcribing a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 17 into an RNA sequence can be provided in the diet of a corn rootworm A corn rootworm feeding upon such plant cells stop feeding, is prevented from developing into an adult beetle is prevented from breeding, dies, or suffers from any or all of these effects as a result of inhibition of the CHD3 homologous protein synthesis

A β-tubulin coding sequence derived from a corn rootworm cDNA library was used to construct a nucleotide sequence encoding a stabilized double stranded RNA A cDNA sequence as set forth in SEQ ID NO 18 encoding a part of an ortholog or a homolog of a β-tubulin amino acid sequence was used to construct a primer pair for use in a thermal amplification reaction using corn rootworm genomic template DNA The primer pair as set forth at SEQ ID NO 19 and SEQ ID NO 20 enabled the amplification of a double stranded genome amplicon, one strand of which exhibited the sequence as set forth in SEQ ID NO 21 Three nucleotide sequence segments were produced from the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 21 A first nucleotide segment (SEQ ID NO 173) was produced using a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 21 as template in a thermal amplification reaction along with the thermal amplification primer pair exhibiting the sequences as set forth in SEQ ID NO 22 and SEQ ID NO 23 A second nucleotide segment (SEQ ID NO 27) was produced using a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 21 as template in a thermal amplification reaction along with the thermal amplification primer pair exhibiting the sequences as set forth in SEQ ID NO 25 and SEQ ID NO 26 A third nucleotide segment (SEQ ID NO 36) was produced using a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 21 as template in a thermal amplification reaction along with the thermal amplification primer pair exhibiting the sequences a set forth in SEQ ID NO 28 and SEQ ID NO 29 The 3' end of one of the strands the first segment is complementary to the 3' end of one of the strands of the second segment so that in a thermal amplification reaction containing both of these segments, these complementary ends hybridize and allow for the polymerase-mediated extension of both strands from their respective 3' ends The 3' end of the other strand of the second segment is complementary to the 3' end of one of the strands of the third segment so that in a thermal amplification reaction containing both of these segments these complementary ends hybridize and allow for the polymerase-mediated extension of both strands from their respective 3 ends In a thermal amplification reaction containing all three segments and their complementary sequences, i e the first, the second and the third segment, along with thermal amplification primer sequences as set forth in SEQ ID NO 22 and SEQ ID NO 29, a new sequence is produced as set forth in SEQ ID NO 31, that when placed under the control of a promoter that functions in plants, can produce an RNA nucleotide sequence substantially identical to the sequence as set forth in SEQ ID NO 31 except that uridine residues are present in place of thymidine residues This RNA nucleotide sequence can form into a stabilized RNA molecule by virtue of the reverse complementarity of the third segment to the first segment, in which the portion of SEQ ID NO 31 corresponding to the third segment from about nucleotide position 358 to about nucleotide position 577 hybridizes to the portion of SEQ ID NO 31 corresponding to the first segment from about nucleotide position 31 through about

nucleotide position 250, and the first and third segments are linked by a second nucleotide sequence segment, which in this example is represented a portion of SEQ ID NO 31 corresponding to the second segment from about nucleotide position 251 through about nucleotide position 357 Expression of a nucleotide sequence corresponding to SEQ ID NO 31 in plant cells results in the synthesis of a stabilized RNA molecule Plant cells transcribing a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 31 into an RNA sequence can be provided in the diet of a corn rootworm A corn rootworm feeding upon such plant cells stop feeding, is prevented from developing into an adult beetle, is prevented from breeding, dies, or suffers from any or all of these effects as a result of inhibition of the β tubulin protein synthesis

Example 4

This example illustrates the synergistic effects of providing in the diet of an invertebrate pest one or more pesticidally effective compositions together with one or more double stranded RNA sequences derived from the invertebrate pest, the one or more dsRNA sequences having previously demonstrated a pesticidal effect when provided in the diet of the pest

As indicated in example 3, providing in the diet of an invertebrate pest a double stranded RNA molecule derived from that pest results in the inhibition of one or more biological functions in the pest and therefore functions to achieve a pesticidal effect, resulting in the mortality of the pest or some other measurable feature that reduces the ability of the pest to infest a particular environment or host The addition of one or more other pesticidal agents each different from each other and each functioning to achieve its pesticidal effect by a means different from the way in which the dsRNA functions to achieve its pesticidal effect, may result in achieving an improvement in the level of pest control and would further decrease the likelihood that the pest would develop resistance to any one or more of the pesticidal agents or dsRNA's when used alone to achieve inhibition of the pest

To test this CRW larvae are allowed to feed on diet into which is incorporated varying amounts of a Cry3Bb rootworm inhibitory protein and a fixed amount of a double stranded RNA formulated above as set forth in Example 2 or 3 such as a dsRNA corresponding to SEQ ID NO 17 or SEQ ID NO 31 A synergistic pest inhibition effect is observed As set forth in Example 2 and 3, an LD50 amount of a variant Cry3Bb was used to achieve about 50% insect larvae mortality with a coordinate reduction in fitness of the surviving larvae as judged by the reduced larvae weights in comparison to negative controls Reducing the amount of the insecticidal protein in the diet results in a coordinate reduction in the mortality rate, and an increase in the mean surviving larval weights The addition of dsRNA corresponding to either SEQ ID NO 31 or to SEQ ID NO 17 results in almost complete mortality at each concentration of Cry3Bb, and a substantial decrease in the mean weight of any survivors This suggests a synergistic effect Synergy may be achieved through the disturbance in the larval mid-gut as a result of the introduction of any amount of Cry3Bb which has been shown to introduce pores into the mid-gut membrane The pores may allow a greater level of the double stranded RNA species to permeate into cells or even into the haemolymph, resulting in a more efficient delivery of the dsRNA species into the larvae, and thus resulting in a more efficient reduction in the suppression of the target mRNA Particular combinations of pore forming compositions along with double stranded RNA compositions results in an enhanced and synergistic pesticidal effect because dsRNA is now more able to be distributed throughout the haemolymph and exert effects on cells and tissues remote from the gut of the pest Particular pore forming

compositions include but may not be limited to insecticidal toxin proteins derived from *B thuringiensis* and related species whether or not these are demonstrated to be insecticidal to a particular insect, and further may include but not be limited to pore forming domains of such toxins Such pore forming compositions may also include one or more such pore forming toxins or domains or combinations thereof, each different from the other, each exhibiting a different mode of action as judged by each toxin or domain channel forming properties including kinetics of ion channel formation, sizes of conductance states, total membrane conductance, ion specificity, and ion channel gating properties Combinations of such pore forming compositions along with dsRNA molecules specific for suppression of one or more genes in a coleopteran species are specifically contemplated herein

Example 5

This example illustrates that the nucleotide sequence fragments of the V-ATPase, when provided in the double stranded RNA form in the diet of a CRW species, are useful for controlling the insect pest

The sequence as set forth in SEQ ID NO 104 is a cDNA clone that represents 1870 nucleotides of a 2400 nucleotide mRNA encoding a protein exhibiting substantial sequence identity to a *Drosophila melanogaster* Vacuolar A I Pase (68kd subunit 2) This cDNA clone was fully sequenced on both strands using primers designed from the initial sequence data These sequencing primers are listed as SEQ ID NO 105 through SEQ ID NO 120 SEQ ID NO 121 and SEQ ID NO 122 are sequences of the primers used to produce a copy of SEQ ID NO 104 from the cDNA in the cloning vector pSPORT (Invitrogen) Each primer contained a 20-nucleotide T7 promoter sequence from nucleotide positions 1 – 20 Nucleotides 21-44 set forth in SEQ ID NO 121 and nucleotides 21-45 of SEQ ID NO 122 correspond to sequences within the pSPORT vector flanking the inserted cDNA These primers allow the amplification of a DNA template containing the cDNA fragment flanked at either end with T7 promoters, allowing for the *in vitro* production of double stranded RNA with a T7 RNA polymerase When double stranded RNA derived from SEQ ID NO 104 was included in the CRW diet, about 80% mortality was observed

Six different regions of SEQ ID NO 104 were tested by using the following sets of amplification primers SEQ ID NO 123 andSEQ ID NO 124, corresponding to nucleotides 1 to 291 (referred to as section #1, 271 base pairs) of SEQ ID NO 1 SEQ ID NO 125 and SEQ ID NO 126 corresponding to nucleotides 292 to 548 (referred to as section #2 260 base pairs), SEQ ID NO 127 and SEQ ID NO 128 corresponding to 549 to 830 (referred to as section #3, 271 base pairs) . SEQ ID NO 129 and SEQ ID NO 130 corresponding to nucleotides 840 to 1345 (referred to as section #4, 505 base pairs) , SEQ ID NO 131 and SEQ ID NO 132 corresponding to nucleotides 1360 to 1621 (referred to as section #5 261 base pairs), SEQ ID NO 133 and SEQ ID NO 136 corresponding to nucleotides 1540 to1870 (referred to as section #6, 278 base pairs) Note that section 5 and 6 overlapped by approximately 80 base pairs When these 6 sections were separately incorporated into CRW diet, sections #1, #2 #3 and #4 showed CRW mortality ranging from 94% to 100% Section #5 and #6 showed no CRW mortality above the background seen in the untreated controls The sequence represented by section #1 was further subdivided into 3 smaller sections, each of these three smaller sections being represented by at least from about 150 to about 180 contiguous nucleotides within section #1, so that the first subsection in section #1 overlapped with the second subsection in section #1 and the third subsection in section

#1 overlapped with the second subsection Each of these subsections were tested separately in the CRW bioassay Mortality between 80 and 90% was observed using these three shorter sequences

A second means for testing the bioactivity of dsRNA molecules derived from CRW genes is to construct a self-complementary RNA molecule By combining the same DNA sequence in the reverse orientation with the T7 RNA polymerase promoter a single RNA molecule can be synthesized which is self complementary One such RNA molecule was constructed by combining the nucleotides 1 through 345 with the nucleotides 50 through 325, from the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO 104 The resulting sequence is as set forth in SEQ ID NO 137 and was designated as pIC17527 pIC17527 was cloned into pTOPT2 1 (Invitrogen) Using the T7 promoter in the pTOPO 2 1 vector a dsRNA approximately 500 base pair nucleotides was produced and incorporated into CRW diet The resulting mortality was between 80% to 100%

Example 6

This example illustrates the oral toxicity of dsRNA s towards larvae of the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*

Total RNA was isolated from larvae of the Colorado potato beetle (CPB) *Leptinotarsa decemlineata*, using the Ambion *mir*Vana kit (Catalog # 1560) and recommended procedures (Ambion Inc , Austin TX) CPB larvae occupying approximately 200 µL volume in a microfuge tube were used for each preparation Five micrograms of total RNA were used to prepare cDNA using the Invitrogen Thermoscript™ RT-PCR system (Catalog # 11146) and recommended procedures for random primer-mediated cDNA synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA) This cDNA was used as a template for amplification of V-ATPase A subunit 2 ortholog sequences using Taq DNA polymerase and the oligonucleotide primers pr 550 (SEQ ID NO 160) and pr552 (SEQ ID NO 161) These primers were designed by aligning the nucleotide sequences for the nearest V-ATPase A orthologs from *Manduca sexta* (SEQ ID NO 151), *Aedes aegypti* (SEQ ID NO 152), *Drosophila melanogaster* (SEQ ID NO 153), and *Diabrotica virgifera* (WCR) and selecting regions of minimal degeneracy Primer pr550 corresponds to nucleotides 230-252 in the *M sexta* gene sequence while primer pr552 corresponds to nucleotides 1354-1331 in the *M sexta* gene sequence

Amplification was achieved using a touchdown amplification procedure with the following cycling parameters

Step 1 94 C, 2 min
Step 2 94 C 30 sec
Step 3 50 C, 2 min,
Step 4 72 C, 2 min
(35 cycles for steps 2-4, with a step down of -0 3 C per cycle for step 3),
Step 5 72 C, 10 min and
Step 6 4 C

The approximately 1 2 kb DNA fragment amplified from the cDNA was cloned into the vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) to yield the recombinant plasmid pIC17105 The nucleotide sequence of the cloned insert (SEQ ID NO 144) shares only 82% nucleotide sequence identity with the V-ATPase A subunit 2 ortholog sequence from the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera*, however, the deduced amino acid sequences for the encoded V-ATPase A proteins share 97% sequence identity

The V-ATPase A ortholog sequence in plasmid pIC17105 was amplified using primers pr568 (SEQ ID NO 162) and pr569 (SEQ ID NO 163), designed as "universal" primers for generating DNA templates with flanking T7 polymerase promoter sequences from pCR2 1-TOPO clones The amplified DNA served as the template for dsRNA synthesis using the Ambion MEGAscript™ kit (Catalog # 1626) and recommended procedures (Ambion Inc , Austin TX) Purified dsRNA derived from the *L decemlineata* V-ATPase A ortholog sequence was fed to larvae of *L decemlineata* in an insect feeding assay

The CPB diet consists of 13 2 g/L agar (Serva 11393), 140 3 g/L Bio-Serve pre-mix (F9380B), 5ml/L KOH (18 3% w/w), and 1 25 ml/L formalin (37%) The diet was dispensed in 200 uL aliquots onto 96-well plates and dried briefly prior to sample application Twenty UL of test sample were applied per well, with sterile water serving as the untreated check (UTC) Plates were allowed to dry before adding insect larvae One neonate CPB larva was added per well with a fine paintbrush Plates were sealed with mylar and ventilated using an insect pin Forty larvae were tested per treatment The bioassay plates were incubated at 27 C, 60% RH, in complete darkness for 10 – 12 days The plates were scored for larval stunting and mortality Data were analyzed using JMP® 4 statistical software (SAS Institute, Cary, N C , USA)

Table 2 Oral toxicity of dsRNA to CPB larvae

Treatment	% Mortality	Std Dev	SEM	95% CI
Untreated check	8 33	10 21	4 17	-2 38-19 04
V-ATPase A dsRNA	87 5	10 83	3 61	79 18-95 82

Based on the oral toxicity bioassay data using a CPB specific V-ATPase dsRNA, CPB infestation of plants can be controlled by providing in the diet of the pest a plant cell expressing one or more dsRNA sequences specific for suppression of one or more genes in a CPB pest

Example 7

This example illustrates the results of bioassays of various lepidopteran larvae on artificial diet using insect specific dsRNA

Total RNA was isolated from 2nd-3rd instar larvae of *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon*, and *Ostrinia nubilalis* using the Ambion *mir*Vana kit (Catalog # 1560) and recommended procedures (Ambion Inc Austin, TX) Larvae occupying approximately 200 µL volume in a microfuge tube were used for each preparation

Five micrograms of total RNA from each of the above lepidopteran species was used to prepare cDNA using the Invitrogen Thermoscript™ RT-PCR system (Catalog # 11146) and recommended procedures for random primer-mediated cDNA synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA) This cDNA was used as a template for amplification of one or more V-ATPase A subunit 2 ortholog sequences specific for each of the lepidopteran species using Taq DNA polymerase and the oligonucleotide primers pr 550 (SEQ ID NO 160) and pr552 (SEQ ID NO 161)

These primers were designed by aligning the nucleotide sequences for the nearest V-ATPase A orthologs from *Manduca sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, and *Diabrotica virgifera* (WCR) and

selecting regions of minimal degeneracy Primer pr550 corresponds to nucleotides 230-252 in the *M sexta* gene sequence while primer pr552 corresponds to nucleotides 1354-1331 in the *M sexta* gene sequence

Amplification was achieved using a touchdown PCR procedure with the cycling parameters as described in Example 6 The amplified DNA products were cloned into pCR2 1-TOPO and sequenced to confirm their identity The recombinant plasmids containing the ortholog gene sequences are listed in Table 3

Table 3. Lepidopteran V-ATPase A subunit 2 ortholog sequences

Plasmid	Insect species	SEQ ID NO
pIC17088	*Spodoptera frugiperda*	SEQ ID NO 145
pIC17101	*Agrotis ipsilon*	SEQ ID NO 146
pIC17102	*Helicoverpa zea*	SEQ ID NO 147
pIC17103	*Ostrinia nubilalis*	SEQ ID NO 148

The V-ATPase A ortholog sequences in plasmids pIC17088, pIC17101, pIC17102 were amplified using primers pr555 (**SEQ ID NO:164**) and pr556 (**SEQ ID NO:165**) designed to generate DNA fragments with flanking and opposing T7 polymerase promoters for *in vitro* dsRNA synthesis

Double-stranded RNAs (dsRNAs) for the FAW, BCW, and CEW ortholog sequences were synthesized from these amplified DNA templates using the Ambion MEGAscript™ kit (Catalog # 1626) and recommended procedures (Ambion Inc , Austin, TX) and submitted for insect bioassays at 10 ppm

For these assays, artificial lepidopteran diet (165g/L Southland Multiple Species Diet, 14 48g/L agar) was prepared and dispensed to 128 well trays, 500ul per well Samples were dispensed over the diet and placed in a "dry down' chamber at 27 C and 35% humidity, where excess water is evaporated off Once dried each well was infested with a single neonate larva and sealed with a perforated mylar seal The trays were incubated for six to eight days at 27 C The untreated control insects had depleted all of the diet in their respective wells at six to eight days Fifty-well trays were prepared with 4 ml artificial diet per well and all insects that were at or near depletion of diet before the assay concluded, were transferred to the new trays These trays were sealed and returned to the incubator and all bioassays were then evaluated after a total of ten to twelve days

The results from these bioassays for the lepidopteran insect species indicate no significant effect on larval mortality or mass gain as compared to the untreated check (comparisons for all pairs using Tukey-Kramer HSD) and using this assay regimen has been observed Effects on larval mortality or mass gain were also not observed in bioassays using combinations of dsRNA and sublethal amounts of pore forming BT insecticidal proteins known from previous experiments to be toxic to these lepidopteran pests

Example 8

This example illustrates a bioassay for determining oral toxicity of dsRNA towards larvae of the cotton boll weevil *Anthonomus grandis*

Total RNA was isolated from larvae of the cotton boll weevil (BWV), *Anthonomus grandis*, using the Ambion *mir*Vana kit (Catalog # 1560) and recommended procedures (Ambion Inc , Austin TX) BWV larvae

occupying approximately 200 ul volume in a microfuge tube were used for each preparation Five micrograms of total RNA were used to prepare cDNA using the Invitrogen Thermoscript™ RT-PCR system (Catalog # 11146) and recommended procedures for random primer-mediated cDNA synthesis (Invitrogen, Carlsbad CA) This cDNA was used as a template for amplification of V-ATPase A subunit 2 ortholog sequences using Taq DNA polymerase and the oligonucleotide primers pr 550 (SEQ ID NO 160) and pr552 (SEQ ID NO 161)

These primers were designed by aligning the nucleotide sequences for the nearest V-ATPase A orthologs from Manduca *sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, and *Diabrotica virgifera* (WCR) and selecting regions of minimal degeneracy Primer pr550 corresponds to nucleotides 230-252 in the *M sexta* gene sequence while primer pr552 corresponds to nucleotides 1354-1331 in the *M sexta* gene sequence

Amplification was achieved using a touchdown amplification procedure with the cycling parameters as described in Example 6 The approximately 1 2 kb DNA fragment amplified from the cDNA was cloned into the vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) and the insert sequenced for confirmation The V-A1Pase A ortholog sequence (SEQ ID NO 149) was amplified using primers pr568 (SEQ ID NO 162) and pr569 (SEQ ID NO 163) designed as "universal" primers for generating DNA templates with flanking T7 polymerase promoter sequences from pCR2 1-TOPO clones

Double-stranded RNAs (dsRNAs) were synthesized from this amplified DNA template using the Ambion MEGAscript™ kit (Catalog # 1626) and recommended procedures (Ambion Inc , Austin, TX) and submitted for insect bioassay

For bioassays of the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman, an agar-based artificial insect diet was used (Bioserv™ - F9247B Gast and Davich, 1966) per manufacturers instructions Approximately 200 ul of molten diet was dispensed into 96-well microtiter plates and allowed to cool and solidify A sample (20ul) containing about 10 ppm dsRNA corresponding to the V-A1Pase A ortholog sequence (SEQ ID NO 149) was then overlaid onto the diet and allowed to dry Insect eggs (0-14) in 25 ul of 0 1% agar were then dispensed onto the diet The plates were then sealed with perforated seals (Zymark #72281) The assay was incubated at 27°C for ten to twelve days and scored for activity by determination of frass accumulation No effects on larval mortality or mass gain were observed, but this may be a result of the particular feeding physiology of the boll weevil Burrowing into the diet may significantly decrease the dose of dsRNA ingested and therefore significantly reduce any effects that would otherwise be observed with a surface feeding physiology Incorporation of the dsRNA into the diet in a uniform manner would likely achieve significant mortality and reduced mass gain

Other target gene sequences from the boll weevil may be cloned and used as templates for the *in vitro* synthesis of dsRNAs that can then be tested in insect bioassay to assess their efficacy For instance, the ribosomal protein L19 (*rpl19*) gene may be used as a template for dsRNA synthesis The nucleotide sequences for the *rpl19* orthologs from *Bombyx mori* (SEQ ID NO 154) *Drosophila melanogaster* (SEQ ID NO 155), *Anopholes gambiae* (SEQ ID NO 156), and *Diabrotica virgifera* (SEQ ID NO 157) were aligned and consensus regions of minimal degeneracy identified for the purpose of designing degenerate oligonucleotide primers Primers pr574 (SEQ ID NO 166) and pr577 (SEQ ID NO 168) or primers pr575 (SEQ ID NO 167) and pr577 (SEQ ID NO 168) may be used to amplify putative rpl19 ortholog sequences from many different insect species

Amplification is achieved using a touchdown amplification procedure with the cycling parameters as described in Example 6 The approximately 0 4 kb DNA fragment amplified from the boll weevil cDNA was

cloned into the vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) and the insert sequenced for confirmation The *rpl19* ortholog sequence (SEQ ID NO 158) was amplified using primers pr568 (SEQ ID NO 162) and pr569 (SEQ ID NO:163), designed as "universal" primers for generating DNA templates with flanking T7 polymerase promoter sequences from pCR2 1-TOPO clones

Example 9

This example illustrates a bioassay for determining oral toxicity of dsRNAs towards larvae of the red flour beetle *Tribolium castaneum*

Some insects pests are commercially important because they infest the commodity products and processed materials produced from a particular crop One particular such pest is the red flour beetle The presence of one or more dsRNA species specific for inhibition of one or more genes in such pests in the commodity product and processed materials produced from a particular crop would be useful in controlling such pest infestation

Total RNA was isolated from larvae of the red flour beetle (RFB), *Tribolium castaneum*, using the Ambion *mir*Vana kit (Catalog # 1560) and recommended procedures (Ambion Inc , Austin, TX) RFB larvae occupying approximately 200 ul volume in a microfuge tube were used for each preparation Five micrograms of total RNA were used to prepare cDNA using the Invitrogen Thermoscript™ RT-PCR system (Catalog # 11146) and recommended procedures for random primer-mediated cDNA synthesis (Invitrogen Carlsbad CA) This cDNA was used as a template for amplification of V-ATPase A subunit 2 ortholog sequences using Taq DNA polymerase and the oligonucleotide primers pr 550 (SEQ ID NO 160) and pr552 (SEQ ID NO 161)

These primers were designed by aligning the nucleotide sequences for the nearest V-ATPase A orthologs from *Manduca sexta, Aedes aegypti, Drosophila melanogaster*, and *Diabrotica virgifera* (WCR) and selecting regions of minimal degeneracy Primer pr550 corresponds to nucleotides 230-252 in the *M sexta* gene sequence while primer pr552 corresponds to nucleotides 1354-1331 in the *M sexta* gene sequence

Amplification is achieved using a touchdown amplification procedure with the cycling parameters as described in Example 6 The approximately 1 2 kb DNA fragment amplified from the cDNA was cloned into the vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) and the insert sequenced for confirmation The V-ATPase A ortholog sequence (SEQ ID NO 150) was amplified using primers pr568 (SEQ ID NO 162 and pr569 (SEQ ID NO 163), designed as "universal primers for generating DNA templates with flanking T7 polymerase promoter sequences from pCR2 1-TOPO clones

Double-stranded RNAs (dsRNAs) were synthesized from this amplified DNA template using the Ambion MEGAscript™ kit (Catalog # 1626) and recommended procedures (Ambion Inc , Austin, TX) and submitted for insect bioassay Wheat flour is uniformly mixed with water and dsRNA corresponding to V-ATPase A ortholog sequence (SEQ ID NO 150) and allowed to dry The composition is used as a bioassay substrate along with red flour beetle larvae Insecticidal effects are observed after several days of incubation by extracting the weevil larvae from the flour/dsRNA mixture

Other target gene sequences from the red flour beetle may be cloned and used as templates for the *in vitro* synthesis of dsRNAs that can then be tested in insect bioassay to assess their efficacy For instance, the ribosomal protein L19 (*rpl19*) gene may be used as a template for dsRNA synthesis The nucleotide sequences for the *rpl19* orthologs from *Bombyx mori, Drosophila melanogaster, Anopholes gambiae*, and *Diabrotica*

virgifera were aligned and consensus regions of minimal degeneracy identified for the purpose of designing degenerate oligonucleotide primers Primers pr574 (SEQ ID NO 166) and pr577 (SEQ ID NO 168) or primers pr575 (SEQ ID NO 167) and pr577 (SEQ ID NO 168) may be used to amplify putative rpl19 ortholog sequences from many different insect species

Amplification is achieved using a touchdown amplification procedure with the cycling parameters as described in Example 6 The approximately 0 4 kb kb DNA fragment amplified from the red flour beetle cDNA was cloned into the vector pCR2 1-1OPO (Invitrogen) and the insert sequenced for confirmation The *rpl19* ortholog sequence (SEQ ID NO 159) was amplified using primers pr568 (SEQ ID NO 162) and pr569 (SEQ ID NO 163), designed as "universal" primers for generating DNA templates with flanking T7 polymerase promoter sequences from pCR2 1-TOPO clones

Example 10

This example illustrates a bioassay for determining oral toxicity of dsRNAs to white grubs and wireworms

Total RNA is isolated from white grub of wireworm larvae using the Ambion *mir*Vana kit (Catalog # 1560) and recommended procedures (Ambion Inc , Austin, TX) Larvae occupying approximately 200 ul volume in a microfuge tube are used for each preparation Five micrograms of total RNA are used to prepare cDNA using the Invitrogen Thermoscript™ R1-PCR system (Catalog # 11146) and recommended procedures for random primer-mediated cDNA synthesis (Invitrogen Carlsbad, CA) This cDNA is used as a template for amplification of V-ATPase A subunit 2 ortholog sequences using Taq DNA polymerase and the oligonucleotide primers pr 550 (SEQ ID NO 160) and pr552 (SEQ ID NO 161)

These primers were designed by aligning the nucleotide sequences for the nearest V-A1Pase A orthologs from *Manduca sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, and *Diabrotica virgifera* (WCR) and selecting regions of minimal degeneracy Primer pr550 corresponds to nucleotides 230-252 in the *M sexta* gene sequence while primer pr552 corresponds to nucleotides 1354-1331 in the *M sexta* gene sequence

Amplification is achieved using a touchdown amplification procedure with the cycling parameters as described in Example 7 The approximately 1 2 kb DNA fragment amplified from the cDNA is cloned into the vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) and the insert sequenced for confirmation The V-ATPase A ortholog sequence is amplified using primers pr568 (SEQ ID NO 162) and pr569 (SEQ ID NO 163), designed as "universal" primers for generating DNA templates with flanking T7 polymerase promoter sequences from pCR2 1-TOPO clones

Double-stranded RNAs (dsRNAs) are synthesized from this amplified DNA template using the Ambion MEGAscript™ kit (Catalog # 1626) and recommended procedures (Ambion Inc , Austin, TX) and submitted for insect bioassay Effects of oral toxicity are observed after several days of bioassay

Other target gene sequences from white grubs or wireworms may be cloned and used as templates for the *in vitro* synthesis of dsRNAs that can then be tested in insect bioassay to assess their efficacy For instance, the ribosomal protein L19 (*rpl19*) gene may be used as a template for dsRNA synthesis The nucleotide sequences for the *rpl19* orthologs from *Bombyx mori Drosophila melanogaster Anopholes gambiae* and *Diabrotica virgifera* were aligned and consensus regions of minimal degeneracy identified for the purpose of

designing degenerate oligonucleotide primers Primers pr574 and pr577 or primers pr575 and pr577 may be used to amplify putative rpl19 ortholog sequences from many different insect species

Amplification is achieved using a touchdown amplification procedure with the cycling parameters as described in Example 7 The approximately 0 4 kb DNA fragment amplified from the cDNA is cloned into the vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) and the insert sequenced for confirmation The *rpl19* ortholog sequence is amplified using primers pr568 (SEQ ID NO 162) and pr569 (SEQ ID NO 163), designed as "universal" primers for generating DNA templates with flanking T7 polymerase promoter sequences from pCR2 1-TOPO clones

Example 11

This example illustrates a bioassay for determining oral toxicity of dsRNAs towards larvae of the mosquito *Aedes aegypti*

Total RNA is isolated from larvae of *Aedes aegypti* larvae using the Ambion *mir*Vana kit (Catalog # 1560) and recommended procedures (Ambion Inc , Austin, TX) *Aedes aegypti* larvae occupying approximately 200 ul volume in a microfuge tube are used for each preparation Five micrograms of total RNA are used to prepare cDNA using the Invitrogen Thermoscript™ RT-PCR system (Catalog # 11146) and recommended procedures for random primer-mediated cDNA synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA) This cDNA is used as a template for amplification of V-ATPase A subunit 2 ortholog sequences using Taq DNA polymerase and the oligonucleotide primers pr 550 (SEQ ID NO 160) and pr552 (SEQ ID NO 161)

These primers were designed by aligning the nucleotide sequences for the nearest V-ATPase A orthologs from Manduca *sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, and *Diabrotica virgifera* (WCR) and selecting regions of minimal degeneracy Primer pr550 corresponds to nucleotides 230-252 in the *M sexta* gene sequence while primer pr552 corresponds to nucleotides 1354-1331 in the *M sexta* gene sequence

Amplification is achieved using a touchdown amplification procedure with the cycling parameters as described in Example 7 The approximately 1 2 kb DNA fragment amplified from the cDNA is cloned into the vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) and the insert sequenced for confirmation The V-ATPase A ortholog sequence is amplified using primers pr568 (SEQ ID NO 162) and pr569 (SEQ ID NO 163), designed as 'universal' primers for generating DNA templates with flanking T7 polymerase promoter sequences from pCR2 1-TOPO clones

Double-stranded RNAs (dsRNAs) are synthesized from this amplified DNA template using the Ambion MEGAscript™ kit (Catalog # 1626) and recommended procedures (Ambion Inc Austin, TX) and submitted for insect bioassay Effects on insect larvae are observed after several days in bioassay

Other target gene sequences from mosquitoes may be cloned and used as templates for the *in vitro* synthesis of dsRNAs that can then be tested in insect bioassay to assess their efficacy For instance, the ribosomal protein L19 (*rpl19*) gene may be used as a template for dsRNA synthesis The nucleotide sequences for the *rpl19* orthologs from *Bombyx mori*, Drosophila *melanogaster*, *Anopholes gambiae*, and *Diabrotica virgifera* were aligned and consensus regions of minimal degeneracy identified for the purpose of designing degenerate oligonucleotide primers Primers pr574 and pr577 or primers pr575 and pr577 may be used to amplify putative rpl19 ortholog sequences from many different insect species

Amplification is achieved using a touchdown amplification procedure with the cycling parameters as described in Example 7 The approximately 0 4 kb DNA fragment amplified from the cDNA is cloned into the

vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) and the insert sequenced for confirmation The *rpl19* ortholog sequence is amplified using primers pr568 (SEQ ID NO 162) and pr569 (SEQ ID NO 163) designed as 'universal" primers for generating DNA templates with flanking T7 polymerase promoter sequences from pCR2 1-TOPO clones

Double-stranded RNAs (dsRNAs) are synthesized from this amplified DNA template using the Ambion MEGAscript™ kit (Catalog # 1626) and recommended procedures (Ambion Inc., Austin, TX) and submitted for insect bioassay

Other mosquito species are contemplated to be within the scope of this invention Suitable target gene sequences from *Aedes Culex*, and *Anopholes* species can be amplified using appropriate oligonucleotide primers cloned into the vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) and the insert sequenced for confirmation The cloned target sequences are amplified using primers pr568 (SEQ ID NO 162) and pr569 (SEQ ID NO 163), designed as "universal" primers for generating DNA templates with flanking T7 polymerase promoter sequences from pCR2 1-TOPO clones

Double-stranded RNAs (dsRNAs) are synthesized from these amplified DNA templates using the Ambion MEGAscript™ kit (Catalog # 1626) and recommended procedures (Ambion Inc., Austin, TX) and submitted for insect bioassay

Example 12

This example illustrates how dsRNA made from the 3'UTR region of V-ATPase showed the down regulation of the target

Segments (ca 300 bp of dsRNA) of the WCR V-ATPase 3' UTR have been put into WCR bio-assay and failed to show stunting and mortality within a 12 day bio-assay period Comparably sized segments within the coding region of the V-ATPase do show significant stunting and mortality at a range of concentrations Northern blots examining total RNA extracted from WCR larvae fed for 4 days on a V-ATPase 3' UTR segment (and probed with a coding region probe) showed a significant decline in the V-ATPase target mRNA relative to untreated control larvae (summarized NBP#7497215) However, detectable message remained, indicating less effective knock-down of the target with a 3' UTR dsRNA segment (vs using a coding region segment) and/or contribution from a putative second V-ATPase gene that has a significantly diverged 3' UTR from the primary V-ATPase gene Southern blot data on WCR is consistent with more than one hybridizing gene sequence within the genome, but examination of ESTs and limited family PCR have not yet demonstrated that a putative second gene is transcribed

It is important to mention that although it is critical to determine the potential to stunt and kill larvae, simply monitoring expression of a target gene by Northern blot or quantitative PCR could also find targets amenable to RNAi strategies The results above plus other northern experiments looking at the V-ATPase target have shown that the RNA effect on transcript abundance is discernable in insects within hours of presentation of the dsRNA

Example 13

This example illustrates one approach to implementing insect pest gene suppression using a ta-siRNA mediated silencing method

An alternative method to silence genes in a plant pest uses the recently discovered class of trans-acting small interfering RNA (ta-siRNA) (Dalmay *et al*, Cell 101 543-553, 2000, Mourrain *et al*, Cell 101 533-542

2000 Peragine *et al*, Genes and Development, 18 2368–2379, 2004 Vazquez *et al* Mol Cell 16(1) 69-79 2004, Yu *et al*, Mol Plant Microbe Interact 16 206-216, 2003) ta-siRNA are derived from single strand RNA transcripts that are targeted by naturally occurring miRNA within the cell Methods for using microRNA to trigger ta-siRNA for gene silencing in plants are described in US Provisional Patent Application Serial No 60/643 136 (Carrington et al 2004), incorporated herein by reference in its entirety At least one pest specific miRNA expressed in gut epithelial cells of corn rootworm larvae is identified This pest specific miRNA is then used to identify at least one target RNA transcript sequence complementary to the miRNA that is expressed in the cell The corresponding target sequence is a short sequence of no more than 21 contiguous nucleotides that, when part of a RNA transcript and contacted by its corresponding miRNA in a cell type with a functional RNAi pathway leads to slicer-mediated cleavage of said transcript Once miRNA target sequences are identified at least one miRNA target sequence is fused to a second sequence that corresponds to part of a pest gene that is to be silenced using this method For example, the miRNA target sequence(s) is fused to sequences of the corn rootworm vacuolar ATPase (V-ATPase) gene The miRNA target sequence can be placed at the 5' end the 3' end, or embedded in the middle of the V-ATPase gene It may be preferable to use multiple miRNA target sequences corresponding to multiple miRNA genes, or use the same miRNA target sequence multiple times in the chimera of the miRNA target sequence and the V-ATPase sequence The V-ATPase sequence can be of any length with a minimum of 21 bp

The chimera of the miRNA target sequence(s) and the V-ATPase sequence is expressed in plant cells using any of a number of appropriate promoter and other transcription regulatory elements, as long as the transcription occurs in cells types subject to being provided in the diet of the pest, e g corn roots for control of corn rootworm

This method may have the additional advantage of delivering longer RNA molecules to the target pest Typically dsRNA's produced in plants are rapidly processed by Dicer into short RNA's that may not be effective when fed exogenously to some pests In this method a single strand transcript is produced in the plant cell taken up by the pest, and converted into a dsRNA in the pest cell where it is then processed into ta-siRNA capable of post-transcriptionally silencing one or more genes in one or more target pests

Example 14

This example illustrates the comparison of CRW cDNA sequences to sequences from sources other than CRW and the identification of (1) sequences in common with those other source sequences and (2) sequences that are unique to CRW cDNA sequences that are conserved between two organisms are potential RNAi candidates that can be used to target the gene expression and function of both organisms Alternatively, it may be desireable to select sequences for CRW gene suppression for which no known homologous sequence is present in (a) other pest organisms, (b) non-target organisms, and (c) the plant genome selected for transformation with the CRW suppression sequence

Six CRW cDNA sequences were selected for comparison to sequences from other sources The specific sequences included sequences encoding alpha-tubulin, beta-tubulin, CHD3, vacuolar proton pump E subunit V-ATPase A subunit, and thread proteins The nucleotide sequences are as set forth in SEQ ID NO 98 SEQ ID NO 99, SEQ ID NO 100, SEQ ID NO 101, SEQ ID NO 102, SEQ ID NO 103, respectively The CRW

cDNA sequences were compared to all public cDNA of various organisms from GenBank using the NCBI megablast program (Altschul et al *J Mol Biol* 215 403-410 1990), the search parameters set as follows

-W 21 -b50 -v50

requiring at least a 21-mer perfect match and retaining only the top 50 best matches and alignments The results were filtered to include only organisms in the *Insecta* order, and honey bee (*Apis mellifera*) was excluded Although the analysis was only done on the six CRW cDNA sequences, the same process may be applied to all cDNA or unigene sequences in CRW or other organism of interest without undue burden or experimentation

Using the six CRW cDNA sequences, a total of 145 matches were identified from 20 distinct insect organisms These included several pest species, such as pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*), Asiatic citrus psyllid (*Diaphorina citri*) and human lice (*Pediculus humanus*)

The results are presented in Table 4 below with coordinates of match on the query sequence and the hit percent identity of the match and the insect species from which the hit seqeuence was derived For example, a segment from nucleotide position 844 to1528 in SEQ ID NO 98 was identified to be substantially identical to a segment from nucleotide position 812 to 128 from GenBank sequence accession number GI 47521748 derived from pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*) These two sequences share about 85% identity

Table 4 CRW Unigene sequences and Insect Nucleotide Sequnce Homologs

SEQ ID NO[1]	Identity Position[2]	Gene ID[3]	Identity Position[4]	% Identity[5]	Genus species[6]
98	171 1529	GI 14279671	89 1447	83%	Chironomus tentans
98	175 938	GI 60297223	69 832	88%	Diaprepes abbreviatus
98	171 779	GI 49394745	79 687	89%	Drosophila melanogaster
98	769 1528	GI 47537494	827 68	85%	Acyrthosiphon pisum
98	529 1339	GI 55814359	56 865	85%	Acyrthosiphon pisum
98	729 1469	GI 46995994	1 741	85%	Acyrthosiphon pisum
98	171 740	GI 49395093	79 652	88%	Drosophila melanogaster
98	166 903	GI 60297353	68 804	85%	Diaprepes abbreviatus
98	171 875	GI 37593891	66 769	85%	Pediculus humanus
98	844 1528	GI 47521748	812 128	85%	Acyrthosiphon pisum
98	351 1255	GI 55798571	1 903	83%	Acyrthosiphon pisum
98	862 1528	GI 55815587	8 674	86%	Acyrthosiphon pisum
98	415 1520	GI 19773419	309 1414	81%	Bombyx mori
98	171 296	GI 19773419	65 190	88%	Bombyx mori
98	415 1520	GI 608680	309 1414	81%	Bombyx mori
98	171 296	GI 608680	65 190	88%	Bombyx mori
98	738 1434	GI 55811699	1 697	85%	Acyrthosiphon pisum
98	171 899	GI 37593910	70 799	85%	Pediculus humanus

702

SEQ ID NO[1]	Identity Position[2]	Gene ID[3]	Identity Position[4]	% Identity[5]	Genus species[6]
98	171 1029	GI 55799535	53 911	83%	Acyrthosiphon pisum
98	817 1492	GI 35508998	7 681	85%	Acyrthosiphon pisum
98	171 845	GI 25959177	50 724	85%	Meladema coriacea
98	862 1528	GI 55803725	726 60	85%	Acyrthosiphon pisum
98	171 695	GI 49394718	79 603	88%	Drosophila melanogaster
98	838 1528	GI 55813912	827 137	85%	Acyrthosiphon pisum
98	171 692	GI 49395499	54-575	88%	Drosophila melanogaster
98	171 1025	GI 46997250	92 945	83%	Acyrthosiphon pisum
98	171 1022	GI 47533429	4 855	83%	Acyrthosiphon pisum
98	171 998	GI 34788002	122 949	83%	Callosobruchus maculatus
98	171 839	GI 25959137	50 717	85%	Meladema coriacea
98	171 677	GI 49395221	84-590	88%	Drosophila melanogaster
98	171 809	GI 25959136	50 688	86%	Meladema coriacea
98	171 816	GI 37593801	66 712	85%	Pediculus humanus
98	171 816	GI 37593472	67 712	85%	Pediculus humanus
98	171 848	GI 25959229	47 724	85%	Meladema coriacea
98	171 677	GI 49395496	75 581	88%	Drosophila melanogaster
98	171 659	GI 49395250	83 571	89%	Drosophila melanogaster
98	171 1029	GI 46997155	98 953	83%	Acyrthosiphon pisum

SEQ ID NO[1]	Identity Position[2]	Gene ID[3]	Identity Position[4]	% Identity[5]	Genus species[6]
98	904 1528	GI 47519891	752 128	86%	Acyrthosiphon pisum
98	199 1061	GI 55813341	8 870	83%	Acyrthosiphon pisum
98	760 1430	GI 60298750	9 679	85%	Diaphorina citri
98	171 998	GI 46997667	106 933	83%	Acyrthosiphon pisum
98	171 785	GI 25959104	69-684	85%	Meladema coriacea
98	922 1528	GI 25959369	697 91	86%	Meladema coriacea
98	922 1528	GI 25959412	698 92	86%	Meladema coriacea
98	171 772	GI 25959233	68 669	86%	Meladema coriacea
98	171 677	GI 49395121	74-582	88%	Drosophila melanogaster
98	199 1029	GI 47534273	1 830	83%	Acyrthosiphon pisum
99	90 1385	GI 34787982	56 1351	83%	Callosobruchus maculatus
99	74 797	GI 25958562	14 739	88%	Curculio glandium
99	572 1374	GI 60297081	25 827	86%	Diaprepes abbreviatus
99	100 1425	GI 19773425	91 1416	81%	Bombyx mori
99	100 1425	GI 2073100	111 1436	81%	Bombyx mori
99	55 738	GI 60297565	7 684	87%	Diaprepes abbreviatus
99	131 1425	GI 39842328	28 1322	81%	Laodelphax striatellus
99	688 1449	GI 60298019	9 770	85%	Diaprepes abbreviatus
99	61 606	GI 49394901	10 557	87%	Drosophila melanogaster

SEQ ID NO[1]	Identity Position[2]	Gene ID[3]	Identity Position[4]	% Identity[5]	Genus species[6]
99	61 605	GI 49395418	12 558	87%	Drosophila melanogaster
99	100 1008	GI 2613140	68 976	81%	Manduca sexta
99	1064 1416	GI 2613140	1032 1384	83%	Manduca sexta
99	61 573	GI 49395445	15 528	87%	Drosophila melanogaster
99	40 582	GI 49395189	4 551	86%	Drosophila melanogaster
99	104 918	GI 47518537	27 841	82%	Acyrthosiphon pisum
99	104 784	GI 25959017	39 719	83%	Meladema coriacea
99	104 879	GI 47538212	85 860	82%	Acyrthosiphon pisum
99	104 852	GI 47520002	32 780	82%	Acyrthosiphon pisum
99	104 789	GI 47519819	118 803	83%	Acyrthosiphon pisum
99	104 789	GI 47532797	106 791	83%	Acyrthosiphon pisum
99	100 708	GI 53910346	73 681	84%	Heliconius erato petiverana
99	100 880	GI 6902132	54 834	82%	Bombyx mori
99	104 789	GI 46999310	91 777	83%	Acyrthosiphon pisum
101	113 263	GI 41578101	124 274	90%	Culicoides sonorensis
101	113 263	GI 41577171	65 215	90%	Culicoides sonorensis
101	113 308	GI 15466250	140 335	86%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 15530478	140 335	85%	Drosophila melanogaster
101	112 308	GI 15516090	140 336	85%	Drosophila melanogaster

SEQ ID NO[1]	Identity Position[2]	Gene ID[3]	Identity Position[4]	% Identity[5]	Genus species[6]
101	113 308	GI 49393479	52 247	85%	Drosophila melanogaster
101	113 263	GI 41577256	99 249	88%	Culicoides sonorensis
101	113 308	GI 41403307	84 279	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 41402978	79 274	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 41401487	82 277	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 38628155	176 371	85%	Drosophila melanogaster
101	118 293	GI 16901350	70 245	87%	Ctenocephalides felis
101	118 293	GI 16900951	78 253	87%	Ctenocephalides felis
101	113 308	GI 14708726	170 365	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14707923	171 366	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14708035	139 334	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14705944	135 330	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14705959	95 290	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14705165	108 303	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14703451	150 345	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14703188	95 290	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14700853	108 303	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14700635	136 331	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14699645	95 290	85%	Drosophila melanogaster

SEQ ID NO[1]	Identity Position[2]	Gene ID[3]	Identity Position[4]	% Identity[5]	Genus species[6]
101	113 308	GI 14697887	94 289	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14697103	136 331	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14696099	137 332	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14696107	136 331	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14695238	95 290	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14693081	133 328	85%	Drosophila melanogaster
101	113 308	GI 14691490	138 333	85%	Drosophila melanogaster
102	694 1364	GI 2454487	811 1481	84%	Aedes aegypti
102	715 1220	GI 22039978	3 507	86%	Ctenocephalides felis
102	694 1175	GI 4734043	166 647	85%	Aedes aegypti
102	895 1286	GI 16899106	3 393	87%	Ctenocephalides felis
102	895 1286	GI 16899780	6 395	87%	Ctenocephalides felis
102	895 1286	GI 16899721	6 396	86%	Ctenocephalides felis
102	961 1286	GI 22039013	8 333	87%	Ctenocephalides felis
102	874 1327	GI 33376955	30-483	83%	Glossina morsitans morsitans
102	636 1136	GI 46997165	360 859	81%	Acyrthosiphon pisum
102	874 1220	GI 33376948	25 371	84%	Glossina morsitans morsitans
102	943 1364	GI 3514814	74 495	82%	Drosophila melanogaster
102	943 1364	GI 24583987	1055 1476	82%	Drosophila melanogaster

SEQ ID NO[1]	Identity Position[2]	Gene ID[3]	Identity Position[4]	% Identity[5]	Genus species[6]
102	694 884	GI 24583987	806 996	82%	Drosophila melanogaster
102	943 1364	GI 24583985	967 1388	82%	Drosophila melanogaster
102	694 884	GI 24583985	718 908	82%	Drosophila melanogaster
102	943 1364	GI 24583983	1052 1473	82%	Drosophila melanogaster
102	694 884	GI 24583983	803 993	82%	Drosophila melanogaster
102	943 1364	GI 18467973	1049 1470	82%	Drosophila melanogaster
102	694 884	GI 18467973	800 990	82%	Drosophila melanogaster
102	943 1364	GI 19527546	1052 1473	82%	Drosophila melanogaster
102	694 884	GI 19527546	803 993	82%	Drosophila melanogaster
102	1045 1365	GI 4734199	1 321	84%	Aedes aegypti
102	943 1280	GI 51961912	81 418	83%	Drosophila simulans
102	734 947	GI 22039138	73 285	87%	Ctenocephalides felis
102	959 1364	GI 24583991	1081 1486	81%	Drosophila melanogaster
102	959 1364	GI 18467977	1081 1486	81%	Drosophila melanogaster
102	943 1340	GI 21355198	994 1391	81%	Drosophila melanogaster
102	694 884	GI 21355198	745 935	82%	Drosophila melanogaster
102	959 1364	GI 19528270	1021 1426	81%	Drosophila melanogaster
102	959 1364	GI 18859618	951 1356	81%	Drosophila melanogaster
102	943 1340	GI 1373432	994-1391	81%	Drosophila melanogaster

SEQ ID NO[1]	Identity Position[2]	Gene ID[3]	Identity Position[4]	% Identity[5]	Genus species[6]
102	694 884	GI 1373432	745 935	82%	Drosophila melanogaster
102	959 1364	GI 5851682	1021 1426	81%	Drosophila melanogaster
102	142 345	GI 22039875	163 366	87%	Ctenocephalides felis
102	142 345	GI 16901137	217 420	87%	Ctenocephalides felis
102	82 595	GI 34787824	112 625	79%	Callosobruchus maculatus
102	142 345	GI 16901267	156 360	87%	Ctenocephalides felis
102	771 1022	GI 22005558	58 309	84%	Aedes aegypti
102	96 357	GI 46996282	118 379	83%	Acyrthosiphon pisum
102	963 1364	GI 18898890	11 412	80%	Anopheles gambiae
102	967 1364	GI 18936027	25 422	80%	Anopheles gambiae
102	61 344	GI 37952369	124 407	81%	Ips pini
103	1230 1251	GI 33371240	247 268	100%	Glossina morsitans morsitans
103	1230 1251	GI 33374947	249 270	100%	Glossina morsitans morsitans

1 WCR SEQ ID NO as set forth in the sequence listing
2 Nucleotide position in the SEQ ID NO in column 1 that exhibits substantial identity with Gene ID in column 3 on same row
3 Gene accession number of corresponding matching sequence identified within public database that exhibits substantial identity with column 1 SEQ ID NO
4 nucleotide position of sequence identified in column 3 that matches with CRW nucleotides specified on same row
5 Percentage identity between the WCR SEQ ID NO and Gene ID (comparison of identity between column 2 and column 4 sequences on any given row) and
6 Genus and species of organism from which the Gene Accession No sequence was derived

Example 15

This example illustrates the identification of predicted protein functional domains and gene families from the translation of the nucleotide sequences disclosed herein using sequence matches to known sequences and existing domain consensus models

The protein sequences were first produced with a translator' program, which translated Unigenes into peptide sequences through the following steps homology to known proteins, model-based *ab initio* gene structure prediction, and longest open reading frame (ORF) Frame shifts due to sequencing errors were corrected The protein sequences were then searched against Pfam database, a large collection of multiple sequence alignments and hidden Markov models (HMM) covering many common protein families (The Pfam Protein Families Database Bateman et al , *Nucleic Acids Research* 32 D138-D141 2004) The protein HMM models were searched with program HMMPAM (Durbin et al , Biological Sequence Analysis Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids Cambridge University Press, 1998), with the default stringencies A further filtering was done to keep only those matches with an expectation value of 0 1 or smaller as significant matches Of the 20303 Corn rootworm peptide sequences, 4199 (21%) were identified with 1317 distinct protein domains and families

The analysis results were presented in the feature fields of the sequence listing file with these attributes Pfam name, Pfam description, and match level with HMMPFAM score, expectation value (E-value) and number of copies of the domain in the peptide sequence

Example 16

This example illustrates a method for providing a DNA sequence for dsRNA-mediated gene silencing More specifically this example describes selection of an improved DNA useful in dsRNA-mediated gene silencing by (a) selecting from a target gene an initial DNA sequence including more than 21 contiguous nucleotides, (b) identifying at least one shorter DNA sequence derived from regions of the initial DNA sequence consisting of regions predicted to not generate undesirable polypeptides, and (c) selecting a DNA sequence for dsRNA-mediated gene silencing that includes the at least one shorter DNA sequence Undesirable polypeptides include, but are not limited to, polypeptides homologous to allergenic polypeptides and polypeptides homologous to known polypeptide toxins

WCR V-A1Pase has been demonstrated to function in corn rootworm feeding assays to test dsRNA mediated silencing as a means of controlling larval growth A cDNA sequence from a vacuolar ATPase gene (V-ATPase) from Western corn rootworm (WCR) (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) was selected for use as an initial DNA sequence (SEQ ID NO 104) This initial DNA sequence was screened for regions within which every contiguous fragment including at least 21 nucleotides matched fewer than 21 out of 21 contiguous nucleotides of known vertebrate sequences Three sequence segments greater than about 100 contiguous nucleotides that were free of such 21/21 hits were identified a first sequence segment corresponding to nucleotide position 739-839, a second sequence segment corresponding to nucleotide position 849-987, and a third sequence segment corresponding to nucleotide position 998-1166 as set forth in SEQ ID NO 104 These three sequence segments were combined to construct a chimeric DNA sequence (SEQ ID NO 1) for use in dsRNA-mediated gene silencing of the corresponding CRW V-ATPase coding sequence The novel chimeric DNA sequence was tested in the CRW bioassay described above

All publications patents and published patent applications mentioned in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication or patent was specially and individually stated to be incorporated by reference

CLAIMS

What is claimed is

1 A method for controlling invertebrate pest infestation comprising providing in the diet of an invertebrate pest an agent comprising a ribonucleic acid that functions upon ingestion by the pest to inhibit the expression of a target sequence within said pest, wherein said ribonucleic acid consists of a ribonucleotide sequence that is or is complementary to said target sequence wherein said ribonucleotide sequence is transcribed from a DNA sequence selected from the group consisting of , SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143, SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 and the complement thereof

2 The method of claim 1 wherein said invertebrate pest is selected from the group consisting of a plant pest and an animal pest and wherein said plant pest is selected from the group consisting of insect pests, mite pests and nematode pests

3 An isolated ribonucleic acid that functions when provided in a diet to an invertebrate pest to control invertebrate pest infestation by inhibiting the expression of a target sequence in said pest said ribonucleic acid comprising a ribonucleotide sequence transcribed from a DNA sequence that is from about 80 to about 100% identical to a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143, SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 and the complement thereof

4 A method for inhibiting expression of a target nucleotide sequence in a plant pest comprising providing in the diet of a pest an agent that upon ingestion by said pest, inhibits the expression of a nucleotide sequence in said pest said agent comprising a ribonucleic acid expressed from a DNA sequence that is from about 80 to about 100% identical to a nucleotide coding sequence present in said pest, said nucleotide coding sequence being selected from the group consisting of , SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143, SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 and the complement thereof

5 A polynucleotide composition for use in a plant cell comprising an expression cassette comprising a plant functional promoter operably linked to a nucleotide sequence element comprising from about 50 to about 5000 contiguous nucleotides exhibiting from about 80 to about 100% sequence identity to a nucleotide coding sequence selected from the group consisting of , SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 and the complement thereof, wherein ingestion of said polynucleotide composition by an invertebrate plant pest inhibits an essential biological function in said pest

6 A plant cell comprising the polynucleotide composition of Claim 5 a plant regenerated from the plant cell, a progeny plant produced from the regenerated plant wherein said progeny plant comprises said polynucleotide composition and a seed produced from the progeny plant, wherein said seed comprises said polynucleotide composition

7 An insect control agent comprising a ribonucleotide sequence produced from the expression of a DNA sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143, SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 and the complement thereof whrein said ribonucleotide sequence functions when ingested by an invertebrate pest to inhibit the expression of a nucleotide sequence substantially complementary to said DNA sequence

8 A method for protecting a plant from insect infestation comprising providing in the diet of said insect one or more cells of said plant expressing an RNA molecule from a DNA sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143, SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174, and the complement thereof wherein ingestion of said one or more cells by said insect results in the inhibition of a biological function in said insect

9 The method of claim 8 wherein said plant cells expressing said RNA comprise a pesticidal agent selected from the group consisting of a patatin, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein a *Xenorhabdus* insecticidal protein, a *Photorhabdus* insecticidal protein, a *Bacillus laterosporous* insecticidal protein and a *Bacillus sphearicus* insecticidal protein

10 The method of claim 9 wherein said *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein is selected from the group consisting of a Cry1, a Cry3, a TIC851, a CryET70, a Cry22, a binary insecticidal protein CryET33 and CryET34 a binary insecticidal protein CryE180 and CryET76, a binary insecticidal protein TIC100 and TIC101 and a binary insecticidal protein PS149B1

11 A method for inhibiting the expression of a target gene product in one or more cells of an insect pest comprising providing to said one or more cells a gene suppressive amount of an RNA molecule in the diet of said insect, wherein said gene suppressive RNA molecule is produced from a DNA sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143, SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174, and the complement thereof, said ingestion of said gene suppressive RNA resulting in a decrease in the level of said target gene product in said insect pest cell

12 The method of claim 11 wherein said DNA sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO 4 SEQ ID NO 17 SEQ ID NO 18 SEQ ID NO 31 SEQ ID NO 32, SEQ ID NO 35, SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44 SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 52 SEQ ID NO 53 SEQ ID NO 56 SEQ ID NO 57, SEQ ID NO 60SEQ ID NO 60, SEQ ID NO 61 SEQ ID NO 64 SEQ ID NO 65, SEQ ID NO 68, SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 72 SEQ ID NO 73, SEQ ID NO 76, SEQ ID NO 77, SEQ ID NO 80, SEQ ID NO 81, SEQ ID NO 84, SEQ ID NO 85, SEQ ID NO 88, SEQ ID NO 89, SEQ ID NO 92, SEQ ID NO 93, SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174, and the complement thereof

13 The method of claim 12 wherein said DNA sequence is selected from the group consisting of 19-21 contiguous nucleotides as set forth in SEQ ID NO 17 and SEQ ID NO 31

14 An expression cassette comprising a DNA sequence as set forth in claim 13

15 The method according to claim 11 wherein said target gene encodes a protein, the predicted function of which is selected from the group of functions consisting of muscle formation, juvenile hormone formation juvenile hormone regulation, ion regulation and transport digestive enzyme synthesis, maintenance of cell membrane potential amino acid biosynthesis amino acid degradation, sperm formation, pheromone synthesis, pheromone sensing, antennae formation, wing formation, leg formation, development and differentiation, egg formation larval maturation digestive enzyme formation, haemolymph synthesis, haemolymph maintenance, neurotransmission, cell division, energy metabolism respiration and apoptosis

16 The method according to claim 11 wherein said insect is a *Diabrotica* spp is selected from the group consisting of *Diabrotica virgifera*, *Diabrotica barberi* and *Diabrotica undecimpunctata*

17 A method for controlling invertebrate pest infestation comprising providing in the diet of an invertebrate pest an agent comprising a first ribonucleotide sequence that functions upon ingestion by the pest to inhibit a biological function within said pest, wherein said ribonucleotide sequence exhibits from about 85 to about 100% nucleotide sequence identity to a coding sequence derived from said pest and is hybridized to a second ribonucleotide sequence that is complementary to said first ribonucleotide sequence, and wherein said coding sequence derived from said pest is selected from the group consisting of, SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 and the complements thereof

18 A method for controlling invertebrate pest infestation comprising providing in the diet of an invertebrate pest an agent comprising a first ribonucleotide sequence that functions upon ingestion by the pest to inhibit a biological function within said pest, wherein said ribonucleotide sequence exhibits from about 95 to about 100% nucleotide sequence identity along at least from about 14 to about 25 contiguous nucleotides to a coding sequence derived from said pest and is hybridized to a second ribonucleotide sequence that is complementary to said first ribonucleotide sequence and wherein said coding sequence derived from said pest is selected from the group consisting of, SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 and the complements thereof

19 A nucleotide sequence encoding an RNA molecule that, when provided in a pest inhibitory amount in the diet of a pest inhibits the pest from feeding on the diet containing the RNA molecule, wherein said nucleotide sequence is selected from the group consisting of, SEQ ID NO 1 through SEQ ID NO 143 and SEQ ID NO 169 through SEQ ID NO 174 and the complements thereof

20 The nucleotide sequence of claim 19, wherein said diet is selected from the group consisting of an artificial diet a plant cell, a plurality of plant cells, a plant tissue, a plant root, a plant seed and a plant grown from a plant seed, wherein said diet comprises a pest inhibitory amount of said RNA molecule

21 The nucleotide sequence of claim 19 wherein said sequence comprises at least about 19 contiguous nucleotides as set forth in SEQ ID NO 97

22 The nucleotide sequence of claim 21 further characterized in that the about 19 contiguous nucleotides are selected from nucleotide position 58 through about nucoleotide 1010 as set forth in SEQ ID NO 97

23 A method for protecting a plant from insect infestation comprising

a) providing in the diet of the insect a plant cell expressing an RNA that suppresses a gene in the insect and performs a function essential for insect survival said function being selected from the group consisting of reduction in feeding by the pest, reduction in viability of the pest, pest cell apoptosis, inhibition of differentiation and development of the pest or any pest cell, absence of or reduced capacity or desire for sexual reproduction by the pest, muscle formation muscle twitching, muscle contraction, juvenile hormone formation juvenile hormone regulation, ion regulation and transport, maintenance of cell membrane potential amino acid biosynthesis amino acid degradation, sperm formation pheromone synthesis pheromone sensing, antennae formation, wing formation leg formation, egg formation, larval maturation, digestive enzyme formation haemolymph synthesis, haemolymph maintenance, neurotransmission, larval stage transition pupation, emergence from pupation, cell division energy metabolism, respiration, and any component of a eukaryotic cells' cytoskeletal structure, and

b) growing a plant comprising said plant cells

24 A method for improving the yield of a crop produced form a crop plant subjected to insect pest infestation, said method comprising the steps of

a) growing said crop plant using seed comprising one or more RNA molecules that suppress one or more target genes in an insect pest that has ingested a portion of said crop plant in its diet wherein said one or more target genes perform at least one essential function in insect physiology and metabolism, said essential function being selected from the group consisting of feeding by the pest, viability of the pest, pest cell apoptosis, differentiation and development of the pest or any pest cell, sexual reproduction by the pest, muscle formation, muscle twitching, muscle contraction juvenile hormone formation and/or reduction juvenile hormone regulation, ion regulation and transport, maintenance of cell membrane potential amino acid biosynthesis, amino acid degradation sperm formation pheromone synthesis pheromone sensing, antennae formation wing formation, leg formation, egg formation larval maturation, digestive enzyme formation, haemolymph synthesis, haemolymph maintenance neurotransmission, larval stage transition, pupation, emergence from pupation, cell division, energy metabolism respiration, cytoskeletal structure synthesis and maintenance, nucleotide metabolism, nitrogen metabolism, water use, water retention and sensory perception and

b) observing an improvement in the percent yield of said crop plant

25 A commodity or commodity product produced from the seed produced from a transgenic plant, wherein said transgenic plant expresses an RNA from one or more contiguous nucleotide sequences selected

from the group consisting of SEQ ID NO 1 to SEQ ID NO 143 SEQ ID NO 169 to SEQ ID NO 174 and the complements thereof, and wherein said one or more nucleotide sequences are detectable within the commodity or commodity product

26 A contiguous nucleotide sequence at least about 21 nucleotides in length, selected from the group consisting of SEQ ID NO 1-143 and 169-174 expressed as an RNA sequence and provided in the diet of an insect pest, wherein ingestion of an insect pest inhibitory amount of said RNA inhibits the pest from further feeding on said diet

27 A plant cell transformed with a contiguous nucleotide sequence at least about 21 nucleotides in length, selected from the group consisting of SEQ ID NO 1-143, and 169-174, wherein said nucleotide sequence is expressed in the plant cell as an RNA segment provided in the diet of an insect pest, wherein (a) ingestion of said RNA by the insect pest results in the suppression of a gene encoding a protein expressed from said gene and (b) ingestion of an insect pest inhibitory amount of said RNA inhibits the pest from further feeding on said diet

28 A method for selecting a nucleotide sequence for expression of a an RNA for use in inhibiting the expression of a gene in an insect pest cell comprising the steps of

(a) isolating a mRNA from a plant pest,

(b) producing an RNA from all or a part of a cDNA sequence derived from the mRNA,

(c) providing the RNA in the diet of the insect pest

(d) selecting an RNA that inhibits expression said gene in said insect pest, and

(e) selecting a nucleotide sequence that hybridizes to said RNA from the group consisting of SEQ ID NO 1-143 169 – 174, or the complement thereof

29 A method for controlling an insect pest comprising providing in the diet of the insect pest two or more insecticidal agents toxic to the same insect species wherein a first insecticidal agent comprises an RNA molecule expressed from a DNA sequence, wherein said RNA molecule inhibits a biological function within said pest when ingested by said pest wherein a portion of said DNA sequence consisting of at least about 21 contiguous nucleotides exhibits from about 85% to about 100% nucleotide sequence identity to a coding sequence derived from said pest, and wherein a second insecticidal agent is provided along with the first insecticidal agent in the diet, wherein said second insecticidal agent is different from the first

30 The method of claim 29 wherein said pest is a corn rootworm and said coding sequence derived from said pest is selected from the group consisting of SEQ ID NO 1 - 143 and 169 - 174

ABSTRACT

The present invention is directed to controlling pest infestation by inhibiting one or more biological functions in an invertebrate pest The invention discloses methods and compositions for use in controlling pest infestation by feeding one or more different recombinant double stranded RNA molecules to the pest in order to achieve a reduction in pest infestation through suppression of gene expression The invention is also directed to methods for making transgenic plants that express the double stranded RNA molecules, and to particular combinations of transgenic pesticidal agents for use in protecting plants from pest infestation

SEQUENCE LISTING

<110> Monsanto Technology LLC
Baum, James A
Gilbertson, Larry A
Kovalic, David K
LaRosa, Thomas J
Lu, Maolong
Munyikwa, Tichifa R. I.
Roberts, James K
Wu, Wei
Zhang, Bei

<120> Compositions and Methods for Control of Insect Infestations in Plants

<130> 38-21(53597)A AR

<150> 60560842
<151> 2004-04-09

<150> 60565632
<151> 2004-04-27

<150> 60579062
<151> 2004-06-11

<150> 60603421
<151> 2004-08-20

<150> 60617261
<151> 2004-10-11

<160> 174

<210> 1
<211> 409
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 1
ggacaagaaa cttgcccaac gtaagcactt cccttcagta gactggcttg gatcatattc 60

caaatattta agagcattgg acgactttta tgacaaaaac tttattcctc ttagaaccaa 120

agttaaggaa attcttcagg aagaagatga tctagccgaa attgtgcagc tggtaggtaa 180

agcatctctg gcagaaacgg acaaaatcac cttggaaatt gccaggcttc ttaaagaaga 240

caaaactcat actcttctta tgacagattc tgtccattct ataaaactgt cggtatgttg 300

agaaacatga tcggtttgta cgacatggcg agacacgctg tagaatcaac cgcacaatca 360

gaaaataaga tcacttggaa cgtaataaga gattcaatga gtggaattt 409

<210> 2
<211> 157
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 2
atgtttcagg tgggctcaat aagcaccaac tttcaatttt atttttcatt tttgtattta 60

tttacagtaa ctcctcagtt tgctaacaat attacattgt taacgcattc atatgttgtt 120

taatataata gttttggaat ataattacaa gtttgtc 157

<210> 3
<211> 338
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 3
atttttattc tgttaatagt ttttcacatt tcatgtttca cacatactta gatctagtca 60

agattgttag agttttggca aagaaattaa ataaaaattc ttttcataaa aatcatttct 120

ttaatattac attagagaaa aattatattt ttatactgag tacaaatttg aacaagttat 180

taattttaag ttacaaaata cgcttttata ggttaacaat tatcaaagcg cttaaatcta 240

atagatacta cacaacatta aggactgcaa accatatctt tcacgaagta atccctacta 300

gtgaccaatt gctcgctagg agcagatgca aattacac 338

<210> 4
<211> 458
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 4
aaaagagtga ggaaacaggt taattataat gacggaggaa tgacaactga cacacgagaa 60

gatacgacat ggcaagaaaa tctctctgat taccattctg acttttctgc gggatcggat 120

gaggataagg aagacgatga tttcgatgag aagaacgacg ccgatttaag cagaaggagt 180

cgaagaaaga tggaaaggaa agacgagaag gatcgtcctt taccaccgtt actagccaga 240

gttggcggca atattgaagt actcggtttt aatgccaggc agcgtaaagc gttccttaat 300

gctattatgc gctacggaat gccaccacaa gacgctttca attcacagtg gctggtgaga 360

gatcttcgag gaaaatctga gaagatattc aaggcttacg tgtctctctt tatgaggcat 420

ctttgcgaac ctggtgcaga taatgctgat acgtttgc 458

<210> 5
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 5
taatacgact cactataggg agagacggag gaatgacaac tgaca 45

<210> 6
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 6
taatacgact cactataggg agattccgta gcgcataata gcat 44

<210> 7
<211> 335
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 7
taatacgact cactataggg agagacggag gaatgacaac tgacacacga gaagacacga 60

catggcaaga aaatctctcc gattaccatt ctgacttttc tgcgggatca gatgaggata 120

aggaagacga tgatttcgat gagaagaacg acgccgattt aagcagaaga agtcgaagaa 180

agatggaaag aaaagacgag aaggaccgtc cactaccacc gttactagcc agagttgggg 240

gaaatattga agtgctcggt tttaatgcca ggcagcgtaa agcgttcctt aatgctatta 300

tgcgctacgg aatctcccta tagtgagtcg tatta 335

<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 8
tctgaattct ccgtagcgca taatagcat 29

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 9
gacgccgatt taagcagaag a 21

<210> 10
<211> 171
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 10
tctgaattct ccgtagcgca taatagcatt aaggaacgct ttacgctgcc tggcattaaa 60

accgagcact tcaatatttc ccccaactct ggctagtaac ggtggtagtg gacggtcctt 120

ctcgtctttt ctttccatct ttcttcgact tcttctgctt aaatcggcgt c 171

<210> 11
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 11
tcttctgctt aaatcggcgt cgaagacacg acatggcaag aaaat 45

<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 12
gatcccgcag aaaagtcaga atggtaatcg ga 32

<210> 13
<211> 112
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 13
tcttctgctt aaatcggcgt cgaagacacg acatggcaag aaaatctctc cgattaccat 60

tctgactttt ctgcgggatc tccgattacc attctgactt ttctgcggga tc 112

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 14
ctccgattac cattctgact tttc 24

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 15
tctggatcct tccgtagcgc ataatagcat 30

<210> 16
<211> 245
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 16
ctccgattac cattctgact tttctgcggg atcagatgag gataaggaag acgatgattt 60

cgatgagaag aacgacgccg atttaagcag aagaagtcga agaaagatgg aaagaaaaga 120

cgagaaggac cgtccactac caccgttact agccagagtt gggggaaata ttgaagtgct 180

cggttttaat gccaggcagc gtaaagcgtt ccttaatgct attatgcgct acggaaggat 240

ccaga 245

<210> 17
<211> 473
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 17
tctgaattct ccgtagcgca taatagcatt aaggaacgct ttacgctgcc tggcattaaa 60

accgagcact tcaatatttc ccccaactct ggctagtaac ggtggtagtg gacggtcctt 120

ctcgtctttt ctttccatct ttcttcgact tcttctgctt aaatcggcgt cgaagacacg 180

acatggcaag aaaatctctc cgattaccat tctgacttttt ctgcgggatc tccgattacc 240

attctgactt ttctgcggga tcagatgagg ataaggaaga cgatgatttc gatgagaaga 300

acgacgccga tttaagcaga agaagtcgaa gaaagatgga aagaaaagac gagaaggacc 360

gtccactacc accgttacta gccagagttg ggggaaatat tgaagtgctc gttttaatgc 420

caggcagcgt aaagcgttcc ttaatgctat tatgcgctac ggaaggatcc aga 473

<210> 18
<211> 536
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 18
accgccatca tgttattggc atcacacatg tgctgtgtga gctctggaac tttcaacggt 60

ctgtattgtt ggctgcctct tgaggtgagt ggagcgaatc cgggcatgaa gaagtggaga 120

cgggggaagg gaaccatgtt gacagccaat tttctaagat cagcattcaa ctgacctggg 180

aacctaagac aggtggttac accggacatt gtgagggata ccaaatggtt taagtctcca 240

tatgtgggtg ttgtgagttt caaagttctg aagcaaatgt catagagagc ttcattatca 300

atacagtatg tttcatctgt gttttctacc aattgatgta ctgaaagtgt ggcattgtat 360

ggttctacta cggtatctga tactttgggt gaggggacta ctgagtatgt gttcataatt 420

ctgtctgggt attcttcacg gatttttgag atagggaggg tacccatacc tgatccagta 480

ccacctccaa gtgagtgtgt gagttggaat ccttgtaaac aatcacatga tcagct 536

<210> 19
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 19
taatacgact cactataggg agagaatccg ggcatgaaga agtg 44

<210> 20
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 20
taatacgact cactataggg agacaaaaat ccgtgaagaa tacc 44

<210> 21
<211> 399
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 21
taatacgact cactataggg agagaatccg ggcatgaaga agtggagacg ggggaaggga 60

accatgttga cagccaattt tctaagatca gcattcaact gacctgggaa cctaagacag 120

gtggttacac cggacattgt gagggatacc aaatggttta agtctccata tgtgggtgtt 180

gtgagtttca aagttctgaa gcaaatgtca tagagagctt cattatcaat acagtatgtt 240

tcatctgtgt tttctaccaa ttgatgtact gaaagtgtgg cattgtatgg ttctactacg 300

gtatctgata ctttgggtga ggggactact gagtatgtgt tcataattct gtctgggtat 360

tcttcacgga tttttgtctc cctatagtga gtcgtatta 399

<210> 22
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 22
actgaattct ccgggcatga agaagt 26

<210> 23
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 23
tattcttcac ggatttgac 19

<210> 24
<211> 267
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 24
actgaattct ccgggcatga agaagtggag acgggggaag ggaaccatgt tgacagccaa 60

ttttctaaga tcagcattca actgacctgg gaacctaagg caggtggtta caccggacat 120

tgtgagggat accaaatggt ttaagtctcc gtatgtgggt gttgtgagtt tcaaagttct 180

gaagcaaatg tcatagagag cttcattatc aatacagtat gtttcatctg tgttttctac 240

caattgatgt caaatccgtg aagaata 267

<210> 25
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 25
caaatccgtg aagaata 17

<210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 26
ctgaaagtgt ggcgttgta 19

<210> 27
<211> 106
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 27
caaatccgtg aagaataccc agatagaatt atgaacacat actcagtagt cccctctccc 60

aaagtatcag ataccgtagt agaaccatac aacgccacac tttcag 106

<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 28
tagaaccata caacgccaca ct 22

<210> 29
<211> 25

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 29
tctggatcca cgggggaagg gaacc 25

<210> 30
<211> 257
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 30
tagaaccata caacgccaca ctttcagtac atcaattggt agaaaacaca gatgaaacat 60

actgtattga taatgaagct ctctatgaca tttgcttcag aactttgaaa ctcacaacac 120

ccacatacgg agacttaaac catttggtat ccctcacaat gtccggtgta accacctgcc 180

ttaggttccc aggtcagttg aatgctgatc ttagaaaatt ggctgtcaac atggttccct 240

tcccccgtgg atccaga 257

<210> 31
<211> 586
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 31
actgaattct ccgggcatga agaagtggag acgggggaag ggaaccatgt tgacagccaa 60

ttttctaaga tcagcattca actgacctgg gaacctaagg caggtggtta caccggacat 120

tgtgagggat accaaatggt ttaagtctcc gtatgtgggt gttgtgagtt tcaaagttct 180

gaagcaaatg tcatagagag cttcattatc aatacagtat gtttcatctg tgttttctac 240

caattgatgt caaatccgtg aagaataccc agatagaatt atgaacacat actcagtagt 300

cccctctccc aaagtatcag ataccgtagt agaaccatac aacgccacac tttcagtaca 360

tcaattggta gaaaacacag atgaaacata ctgtattgat aatgaagctc tctatgacat 420

ttgcttcaga actttgaaac tcacaacacc cacatacgga gacttaaacc atttggtatc 480

cctcacaatg tccggtgtaa ccacctgcct taggttccca ggtcagttga atgctgatct 540

tagaaaattg gctgtcaaca tggttccctt cccccgtgga tccaga 586

<210> 32
<211> 399
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 32
acgcgtccag ttaatatccc gtgagatatt tttgcagtcc ttttaataag attcttcata 60

attcaccatg aagggctgcg ttttcaacat cgacaacggt tatttggaag gcctgtgtcg 120

tggctttaaa tgtgggatcc tgaaacacgc cgattatttg aatttggtcc agtgtgaaac 180

tcttgaagat ttaaaactgc acttgcaagg cactgactat ggaacttttt tggccaatga 240

accttcacct ttgtcagtat ccgtcatcga ttcaagactt cgacaaaaac tcctgattga 300

gttccagcac atgcgtaacc aagcagtaga gcctctctcg acatttatgg gcttcattac 360

ctacagttac atgatcgaca acataatttt gcttattac 399

<210> 33
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 33
taatacgact cactataggg agaaacggtt atttggaagg 40

<210> 34
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 34
taatacgact cactataggg agattgtcga tcatgtaact gta 43

<210> 35
<211> 291
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 35
taatacgact cactataggg agaaacggtt atttgcaagg tttgactgta tattattatt 60

tttatgtatc gacatygatg aattgattta tttatcgtaa agaaattcaa atacatttaa 120

agcttcaaat attaataata atgaacaagc tttgaagggt tacaaacaac caatcgatct 180

attaatatag tctattgact ctgaagttgc aaacggtaat agggccaatg caatggtttg 240

attctcccta cagttacatg atcgacaact ccctatagtg agtcgtatta a 291

<210> 36
<211> 451
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 36
ccacatacca cgctatgaaa ccccccttata tggggccgat ctaacaggag tgtggaactc 60

tatatccatt atatctaaaa tggttaacag aaaagaattc ataattaaca ttcaattgcc 120

attgtacacg tatattctgg taaatctact actactggac atttaattta caaatgtagt 180

ggtatcgaca aacttaccat cgaaaagttc caaaaagaat cccaacaaat gggtaaaggc 240

taattcaaat atgcctgggt actctacata cttacagccc atagagaacg tggtattacc 300

attgatattg ctgtgcggaa attcgaaaca gctaaatact attgaaccat cattgatgcc 360

cctggcacag atatttcatt aataacatta tcactggtac attacaatct gactgtgctg 420

tactcattga tgcaactggt acttggtaat t 451

<210> 37
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 37
taatacgact cactataggg agacacgcta tgaaaccccc ttat 44

<210> 38
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 38
taatacgact cactataggg agatttcgaa tttccgcaca gc 42

<210> 39
<211> 933
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 39
taatacgact cactataggg agatttcgaa tttccgcaca gcaagtgtgt aacttaaatt 60

tcaaaaaact tttcgttgtc ccaatttttt ttcataatct tagcggttac gattcgcata 120

tgatgattag agatcttgcg aaaaatggta gtatcagctt actaccaata aataaggaaa 180

agtatatttc atttacaata tacgattctg aggtcagtat taggttgagg ttcgttgatt 240

cactgagatt tttaaattca tcattggaca agttggctgc cacattgcaa cctgaggatt 300

taagatattt agctagcgaa tttccaaata ccactaccga acaaatggaa ttattgaaac 360

gaaaaggcat attcccatac gaatatattg agtctttcaa taaattgaat gaaacgcaac 420

taccatcaat tgataaattt tacagctcat tatcgggtga aaacatctcc aaaaatatgt 480

atcatcatgc tcagaatgtt tggcagtcat tcggtattaa aaatattttg gaatatagta 540

tgttgtacat gaaaactgat attatgttac tgacttgcat ttttgaaaat tttcgacaaa 600

aatgtcgaag tacatacagt cttgatcctg catggtacta taccatgcct ggattttctt 660

gggatgcaat gcttaaatat actggatgta aacttgaact gctgaatgat atcgataaaa 720

tcatgtttat tgagaaagct atccgaggtg gtataagtca agtaagtaat cggtattctg 780

aggcaaataa caaatacatg cataattatg atccatcaaa gcctagtaaa tatgtgctat 840

atttagatgt caacaatttg tatggttggg caatgtctca attattacca taaggggtt 900

tcatagcgtg tctccctata gtgagtcgta tta 933

<210> 40
<211> 918
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 40
cccaagcgtc cgcccacgcg tccgcccacg cggcccccc cgccgcccgc acggtgtgga 60

cctcgcgcct ggtgttacat cccaagtagt gttcctttta ttctaagttt aatttcgaac 120

agttgcattt actttatttc caaacaatca aaatgggtaa agaaaagatt catattaaca 180

tcgttgtcat tggacacgta gattctggta aatctactac tactggacat ttaatttaca 240

aatgtggtgg tatcgacaaa cgtaccatcg aaaagttcga aaaagaagcc caagaaatgg 300

gtaaaggttc attcaaatat gcctgggtac tcgacaaact taaggccgag agagaacgtg 360

gtattaccat tgatattgct ttgtggaaat tcgaaacagc taaatactat gtaaccatca 420

ttgatgcccc tggacacaga gatttcatta agaacatgat cactggtaca tcacaagctg 480

actgtgctgt actcattgtt gcagctggta ctggtgaatt tgaagcaggt atttcaaaga 540

atggacaaac acgtgaacat gctcttcttg ctttcaccct tggtgtaaaa caacttattg 600

ttggtgtcaa caaaatggac tcgactgaac cagcatacag tgaatcacgt ttcgaggaaa 660

tcaagaagga agtatcctca tacatcaaga aaattggtta caacccagct gccgttgctt 720

tcgtaccaat ttcaggatgg cacggagaca acatgttaga aggatctgac aagatgccat 780

ggttcaaggg atggcaaatc gaacgtaaag aaggaaaagc tgaaggaaag tgcttgattg 840

aggctttgga tgctatcctt cccccacctc gtccaactga gaaacccctc cgtcttccac 900

tccaggatgt ctacaaaa 918

<210> 41
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 41
taatacgact cactataggg agacctcgcg cctggtgtta c 41

<210> 42
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 42
taatacgact cactataggg agaccaaggg tgaaagcaag aagag 45

<210> 43
<211> 569
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 43
taatacgact cactataggg agacctcgcg cctggtgtta catcccaagt agtgttcctt 60

ttattctaag tttaatttcg aacagttgca tttactttat ttccaaacaa tcaaaatggg 120

taaagaaaag attcatatta acatcgttgt cattggacac gtagattctg gtaaatctac 180

tactactgga catttaattt acaaatgtgg tggtatcgac aaacgtacca tcgaaaagtt 240

cgaaaaagaa gcccaagaaa tgggtaaagg ttcattcaaa tatgcctggg tactcgacaa 300

acttaaggcc gagagagaac gtggtattac cattgatatt gctttgtgga aattcgaaac 360

agctaaatac tatgtaacca tcattgatgc ccctggacac agagatttca ttaagaacat 420

gatcactggt acatcacaag ctgactgtgc tgtactcatt gttgcagctg gtactggtga 480

atttgaagca ggtatttcaa agaatggaca aacacgtgaa catgctcttc ttgctttcac 540

ccttggtctc cctatagtga gtcgtatta 569

<210> 44
<211> 440
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 44
tcgcgggccg acacacgcct ccatattaag tcttgaaagt catttttaaa aacattttaa 60

tttaaaagta gtatttttaa gatttttcat tttcacacca gttcataatg gcatctggtt 120

caatatacga cgctgcacat aagggagatt ttgaatatgt ttcccaaaag attgaagagg 180

atccactaat tataaaagca ccagactcta gtaaaaggct tctaattcat tgggcagttc 240

tcagcggaaa tgtaaagctt gttactcatt tactggaact tggatcttct gtgaacccct 300

cggatgatac agatatgaca ccattaatat tagcttcatc ggctggccat accgaagttg 360

tcaaattgtt attaaaaaaa tgtgatgatg tcaatcataa aaatgcacag ggtcattcat 420

cacttcagta tgcagcctcc 440

<210> 45
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 45
taatacgact cactataggg agaacgctgc acataaggga gatttt 46

<210> 46
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 46
taatacgact cactataggg agaggaggct gcatactgaa g 41

<210> 47
<211> 1113
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 47
taatacgact cactataggg agaacgctgc acataaggga gattttgact atgtttcaga 60

aaagattgaa gagtttccaa taattttaga agcaccagac tctgtaagtt gtaattattt 120

gtatattatt atctaacgtt aatctctaga cgaaccttta ttatatccaa tctctaccgt 180

gcaatactaa aatgtaccac gtacatttgt agttcctttg atttttttaa tttcattttt 240

ttaacaggtt ttgcaaatgt atacattttt attttggtta catagtcagg ttatacagtc 300

cgtataattt caataatttc tctatctagt atagaaccca tgtcacctta tcaacctatt 360

atcctgcata tttaaatgca gtaaaaccac atttaaaaac atattttctg gtatctcata 420

gccatttgta tcctctaatg gatgtgcata ggcttcttct aaagttttct agtttctatg 480

aagttacaaa gtagtttcct gttattctct tgagaacatt tgttcatatg ataggtggtt 540

catattatct gacagtttca gcttacaagt gaagcagtag catctccaga agatgccaac 600

ccctagtgtt ggtgaaacgt cgagaactac ttgacagtct aagagcccca acaaacagtt 660

taacaagttg gtgtgcattt agttgataga attctgtcag gttcttggat actccattgt 720

attggtttat tttatttaac taatttcctc tctcttggtt ctctttacta ttccaaacct 780

aaaaattttt tattgtatag attcattttg ttgttgagct tatatattgt gctattgacc 840

aataatcaaa tacttttag agtaagaggc ttgtaattca ttgggcagtt ctcagcggaa 900

atgtaaagct tgttacctat ttactgaaac ttggatctcc tgtgaactcc tcagatgata 960

cagatatgac accattaata ttagcttcat cagctggcca taccgaagtt gtcaaattgt 1020

tattaaaaaa atgtgatgat gtcaatcata aaaatgcaca gggccattca tcacttcagt 1080

atgcagcctc cctccctata gtgagtcgta tta 1113

<210> 48
<211> 425
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 48

aggattttct gaagctgccg aagtaactgg actcaatcca gcccaaatat ccgtcattat 60

gaagaacctg atggctcgat tgggattcca gaagtactac cttcagggag gtgattgggg 120

ttccgcaata gtagccaact tagcatcatt attcccagaa aaagtgctgg gagtccattc 180

caatatgtgt atggtcaata gtatgctttc taatctaaaa ttagcattgg gtagttttat 240

gccatccttg attgttgatg ctgacaagca acatctcctt tatcccagaa tgaaacattt 300

tggattcctt atattggaaa gtggttatat gcatcttcag ggtagtaaac cagataccgt 360

tggtgtcgct ctacgtgata gccctgtagg tcttgcagct tacatcatag agaagtttca 420

cacat 425

<210> 49
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 49
taatacgact cactataggg agatctgaag ctgccgaagt aa 42

<210> 50
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 50
taatacgact cactataggg agatatcacg tagagcgaca ccaa 44

<210> 51
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 51
taatacgact cactataggg agactatgat gtaagctgca agaccta 47

<210> 52
<211> 95
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 52
taatacgact cactataggg agatcgcgat gagtagaccc aacacctctg gtaagggctc 60

tcatgcattg tttctcccta tagtgagtcg tatta 95

<210> 53

<211> 427
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 53
gacgcgcggg tcgatgcaag actctagata gagtcgtaat attgtcaact ttttcgtttc 60

ggtaaaattt atactaacta gccgtcagaa aagttactaa ttctccagtt atttaattga 120

gaatttgact ttattcgtca ctagcgcaat aactcagtat ggtgattatt aattcattta 180

aacaccccga gtctcctatt aggtatcaac aggacgatgt tcaagtctac ttagacaaga 240

aagatttggg cctgggaact ttatttgtta gtgaaagcac attatgctgg caacaagaag 300

agaacaatgg ttttgctatt gaatattcaa gtatttcctt gcatgccata tctaaagatt 360

taaacattca ttctacagaa tgtgtatacc tcgtgacaga tggacatatt actatgccag 420

gtgacag 427

<210> 54
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 54
taatacgact cactataggg agactagccg tcagaaaagt tac 43

<210> 55
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 55
taatacgact cactataggg agaatggcat gcaaggaaat a 41

<210> 56
<211> 318
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 56
taatacgact cactataggg agactagccg tcagaaaagt tactaattct ccagttattt 60

aattgagaat ttgactttat tcgtcactag cgcaataact cagtatggtg attattaatt 120

catttaaaca ccccgagtct cctattaggt atcaacagga cgatgttcaa gtctacttag 180

acaagaaaga tttgggcctg ggaactttat ttgttagtga aagcacatta tgctggcaac 240

aagaagagaa caatggtttt gctattgaat attcaagtat ttccttgcat gccattctcc 300

ctatagtgag tcgtatta 318

<210> 57
<211> 431
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 57
caattattca cagaacaaca attatacaga atagaccact atttgggtaa ggaaatggta 60

cagaatttaa tgacacttcg atttggtaac agaatcttta accccacatg gaacagtgac 120

catatagctt ccatccaaat aaattgtaag gaacccttcg gaactgaagg cagaggaggg 180

tattttgacg aattcggcat tattagggat gtaatgcaga atcatatttt acaaattcta 240

gctctagtag ctatggaaaa accagcttca gttcaaccag acgatataag aaatgaaaag 300

gtaaaggtat taaaaagtat agctccaata aagctcaagg acgttgtatt gggtcagtac 360

gttggaaatc ctgatggaca aggtaatgcg aaattgggat acttagatga tccgagtgtt 420

cctaaagatt c 431

<210> 58
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 58
taatacgact cactataggg agaacagtga ccatatagct tccatcc 47

<210> 59
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 59
taatacgact cactataggg agaatttcgc attaccttgt ccatc 45

<210> 60
<211> 328
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 60
taatacgact cactataggg agaacagtga ccatatagct tccatccaaa taaattgtaa 60

ggaacccttc ggaactgaag gcagaggagg gtattttgac gaattcggca ttattaggga 120

tgtaatgcag aatcatattt tacaaattct agctctagta gctatggaaa aaccagcttc 180

agttcaacca gacgatataa gaaatgaaaa ggtaaaggta ttaaaaagta tagctccaat 240

aaagctcaag gacgttgtat tgggtcagta cgttggaaat cctgatggac aaggtaatgc 300

gaaattctcc ctatagtgag tcgtatta 328

<210> 61
<211> 483
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 61
acccacgcct accccgcccc gtgatattta gtgcttactt ggtacagcag tttcagtgct 60

gtgctttaga ataatttatt ttttaacatt tatatagaaa tcaaatacta accaatcaac 120

atgtgtgaag aagaagttgc cgctttagtc gtagacaatg gatccggtat gtgcaaagct 180

ggttttgctg gggatgatgc acctcgtgct gtattccctt caattgttgg acgcccaaga 240

catcagggtg tgatggtagg aatgggacaa aaagattcct atgtaggtga tgaagctcaa 300

agtaaaagag gtatccttac cttaaaatac cccatcgagc acggaatagt cacaaactgg 360

gatgatatgg agaaaatttg gcatcataca ttctacaatg aactcagagt agccccagaa 420

gaacaccctg ttctgttgac agaagctcct,ctcaacccca aggccaacag ggaaaagatg 480

aca 483

<210> 62
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 62
taatacgact cactataggg agaccgcccc gtgatattta gtgct 45

<210> 63
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 63
taatacgact cactataggg agactgttgg ccttggggtt gagag 45

<210> 64
<211> 503
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 64
taatacgact cactataggg agaccgcccc gtgatattta gtgcttactt ggtacagcag 60

tttcagtgct gtgctttaga ataatttatt ttttaacatt tatatagaaa tcaaatacta 120

accaatcaac atgtgtgaag aagaagttgc cgctttagtc gtagacaatg gatccggtat 180

gtgcaaagct ggttttgctg gggatgatgc acctcgtgct gtattccctt caattgttgg 240

acgcccaaga catcagggtg tgatggtagg aatgggacaa aaagattcct atgtaggtga 300

tgaagctcaa agtaaaagag gtatccttac cttaaaatac cccatcgagc acggaatagt 360

cacaaactgg gatgatatgg agaaaatttg gcatcataca ttctacaatg aactcagagt 420

agccccagaa gaacaccctg ttctgttgac agaagctcct ctcaacccca aggccaacag 480

tctccctata gtgagtcgta tta 503

<210> 65
<211> 407
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 65
aggtgaatgt tatatcgttt ttcaaagtgt aaggtgttta ttttcaaaaa gtttataaaa 60

taagcaatca ctatgggtaa tgtgtttgca aatttattca aaggcctctt tggcaaaaag 120

gaaatgagga tattgatggt acgactcgat gcagctggta aaaccacaat tttatataaa 180

cttaaattag gagaaattgt aacaactatt ccaacaattg gatttaatgt ggagactgta 240

gaatataaga acattagttt tacagtatgg gatgtaggtg gtcaagataa aattaggcca 300

ttgtggagac actatttcca aaacacacaa cgcctaattt tcgtagtaga cagtaaccac 360

acggaaacta acactgaggc taaagattaa ttaatgcgtt agttggg 407

<210> 66
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 66
taatacgact cactataggg agaactatgg gtaatgtgtt tg 42

<210> 67
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 67
taatacgact cactataggg agagtttccg tgtggttact 40

<210> 68
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 68
taatacgact cactataggg agaactatgg gtaatgtgtt tgcaaattta ttcaaaggcc 60

tctttggcaa aaaggaaatg aggatattga tggtacgact cgatgcagct ggtaaaacca 120

caattttata taaacttaaa ttaggagaaa ttgtaacaac tattccaaca attggattta 180

atgtggagac tgtagaatat aagaacatta gttttacagt atgggatgta ggtggtcaag 240

ataaaattag gccattgtgg agacactatt tccaaaacac acaacgccta attttcgtag 300

tagacagtaa ccacacggaa actctcccta tagtgagtcg tatta 345

<210> 69
<211> 456
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 69
tcgcgggtcg atacaagcgt ctaaacacac gttctgatga catcaatttc taaaaatgtt 60

cgcaaattcc taccaaagcg gcttcatttc aatattctac agcgtaggaa gtaatccact 120

agcattatgg gacaagcagg taaagaacgg acatatcaga cggattatgg acgatgatgt 180

gaaatcatta gttttggaaa tatctggaac taatgtagct actacttata taacgtgccc 240

catcaaacca cgagcttcac ttggaatcag attacctttt ctgattatga ttataaagaa 300

tatgaagaag tactttacat ttgaaattca aatattagat gataaagata tgcgtagaag 360

gtttagaata tcaaatttcc aatcatccac caaagtgaga ccgttctgta caacgatgcc 420

aatgggactc agcagtggct ggaatcaagt tcaatt 456

<210> 70
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 70
taatacgact cactataggg agacgggtcg atacaagcgt ctaa 44

<210> 71
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 71
taatacgact cactataggg agaagtccca ttggcatcgt tgta 44

<210> 72
<211> 472
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 72
taatacgact cactataggg agacgggtcg atacaagcgt ctaaacacac gttctgatga 60

catcaatttc taaaaatgtt cgcaaattcc taccaaagcg gcttcatttc aatattctac 120

agcgtaggaa gtaatccact agcattatgg gacaagcagg taaagaacgg acatatcaga 180

cggattatgg acgatgatgt gaaatcatta gttttggaaa tatctggaac taatgtagct 240

actacttata taacgtgccc catcaaacca cgagcttcac ttggaatcag attacctttt 300

ctgattatga ttataaagaa tatgaagaag tactttacat ttgaaattca aatattagat 360

gataaagata tgcgtagaag gtttagaata tcaaatttcc aatcatccac caaagtgaga 420

ccgttctgta caacgatgcc aatgggactt ctccctatag tgagtcgtat ta 472

<210> 73
<211> 503
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 73
cacgcgtcca aaatcaatcc ttgaaaaaag gcaacttcac ggaactttta caaaaactta 60

gtaaggttct aaaaccccag ggatacttat taagtgcagc agctccggga gcacgtgata 120

aaattgatga accttacgac attccagcga tttcaaagct actagacttg gtcaatgtta 180

tggttttcga tttccacggc gcttttgaca actatgtagg acatatctca ccgcttttc 240

ccgctaaagt tgactacgat tactataata ataaaacata caatgtggat acaggaattc 300

aatattggtt gaatggtggt gcagatcctg caaaattaaa cttgggtgtt gtcgcttatg 360

gaagaacttt tactttggct gataaaaata ataccgctct atatgctcct gtcaaaggtg 420

gaggtacagt tggaccttat tcacaacaat ctggatattt gggatataat gagatttgca 480

gatactatac cgactcaact tac 503

<210> 74
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 74
taatacgact cactataggg agacacgcgt ccaaaatcaa tc 42

<210> 75
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 75
taatacgact cactataggg agatcggtat agtatctgca aatctca 47

<210> 76
<211> 417
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 76
taatacgact cactataggg agacaaacat caggtgcgga aaaaacacga gaggctaata 60

ccaagtgatg ccgacgttgc caaatggaga tgtgttggtc ttctgtcagt cacaaccgca 120

aggcagtgtg aaatgtgaag ttatgtgatt tactttgaaa aaaacagata aggattacgt 180

aagatgagca attcatgtac tagtacaatt aaagttattg aaaataacac aattcttgta 240

gaatggcaaa aacatcatta tggtcatatt tttgattcgc aacatattaa tttacaaaag 300

aaagataata acataatagg ttcaaagcta atatcggagt cccatagcaa aggtaaaaaa 360

attgtttttc ttttttttct tacttaaaaa attctctccc tatagtgagt cgtatta 417

<210> 77
<211> 927
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 77
aggtaaatgc tcaacatgaa ggtgctagtg ttactctcgg tactatctgc atttcttgtt 60

tgccaaacat caggtgcgga aaaacgggtc gtttgttatt tcgccagttg gaccatttat 120

agagcaagaa aaggtgcttt cgatgtcagt aatatagatc catcgctgtg tacacacatt 180

aattttgctt tccttggtct taatgaagat ggttctattc acattttgga ttcctgggag 240

tcaagtgatg ctggtggtca tgagggtttt aaacatctcg tagagcttaa aaagaccaat 300

cctgacctta aggtatgtgt aagtatgggc ggttggaacg aaggttccaa gcagtattca 360

gcagtagcat cagatccagc aaaaagagta aaacttgcag atgaggtttt agcttttatc 420

gaaaattggg gcttcgatgg ttttgatttg gattgggaat atccaggatt acgaggagga 480

aacgaaacta ttgataaaga gaattatgtc gaacttttga aagctcttag tgacgttctt 540

gagcccaaag gatacttact cagtgtagcc actgcaggcg ccgttgaaaa aatcgacgtt 600

ggatttgacg tctcagttat aaatgagttg gtggatatga ttaacgttat ggtttttgat 660

tttcatggag catttgagaa ctttgtagga cacgtttcac cattgttccc agctcaagtt 720

gattacgaat atgaagctaa tagtacatac aatgtagaca caggaatcca acactggata 780

ttgagtggtg cagatcccgc aaaaataaac ctcggcattg tcacctatgg aagaacctat 840

accttagctg ataaaaccaa tacttctctt tatgcaaatg ttaccggtgg tggtaataca 900

gggccatatt ctgcacaatc tggatat 927

<210> 78
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 78
taatacgact cactataggg agacaaacat caggtgcgga aaaa 44

<210> 79
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 79
taatacgact cactataggg agacgggatc tgcaccactc aata 44

<210> 80
<211> 912
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 80
taatacgact cactataggg agacgggatc tgcaccactc aataatatta aaactactat 60

aaaaatatga ctagttattc agaagattta atcataatct aaaaaagtgc aatacatttt 120

taataaacta tgatttattt atcccgcggt aaacactaaa aacactatat attatacata 180

aagataaatt aatacagtca aatactatta atttattctc tgaagtacgg gccattactt 240

tgtttacatg tttgtatact aacctgtaga acgttattcc tgaagatttt ttattaacat 300

tgcttctgct actgcaacta cgttgagaac aagaagccat tattatgcac tatcacaata 360

tattattaca gtttctataa aagtattaaa aaactaaaaa tattcgaaag acaacaaacg 420

taaacaaaca tatacgatct gtcaaaagtg tcacaacaat cttaacgata tggccgaagt 480

gaggtcgttt ttagtcacgt gatgccttct ccatagattc taactcgatg gtgtagacgc 540

aaatagcgac atctgataat aaaatcgtga actaattttc gaaaccaaat tcagaatttc 600

gctttaatct gtgccttcta agaattgcaa ggcaagacag acgttgataa agatgttaga 660

tataagtttg atataagtag atataagttt gattattact tacaataggg acagcatcta 720

attattttta gcacactcac ttgctgccaa caatactggc cgcaaaacta ggtaatagag 780

aaatagtgta tattaaggaa tgaactgact ggtcgcaagc tcttgcttgt cggacctttc 840

cttacgaagt tgcttgacga ctgtattatt tttccgcacc tgatgtttgt ctccctatag 900

tgagtcgtat ta 912

<210> 81
<211> 342
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 81
ggagcgaagg catctctctc catcccgacc tctcgtggcc gccgcgaaga aaaggagctt 60

atcatggctt caaaacgtat cctgaaggaa ctgaaggact tgcagaaaga tcctccgaga 120

tcatgcagtg caggtccttc tggcgaggat atgttccatt ggcaggcaac aattatgggt 180

cctcctgata gtccctatgc tggaggtgtt ttcttagtga atatccattt ccccccggac 240

tacccttca agcctccgaa ggtatcgttc aagacaaagg tcttccatcc gaacatcaat 300

agcaatggag gcatatgcct cgacattctg aaggagcaat gg 342

<210> 82
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 82
taatacgact cactataggg agactctcca tcccgacctc tc 42

<210> 83
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 83
taatacgact cactataggg agatgcctcc attgctattg at 42

<210> 84
<211> 344
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 84
taatacgact cactataggg agactctcca tcccgacctc tcgtggccgc cgcgaagaaa 60

aggagcttat catggcttca aaacgtatcc tgaaggaact gaaggacttg cagaaagatc 120

ctccgagatc atgcagtgca ggtccttctg gcgaggatat gttccattgg caggcaacaa 180

ttatgggtcc tcctgatagt ccctatgctg gaggtgtttt cttagtgaat atccatttcc 240

ccccggacta ccccttcaag cctccgaagg tatcgttcaa gacaaaggtc ttccatccga 300

acatcaatag caatggaggc atctccctat agtgagtcgt atta 344

<210> 85
<211> 674
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 85
tcggcggccg gtaaggaact ttaaaccgga atggtcaaaa aacaaaatcc tggcataatg 60

gggaaaattg gaattaacgg ttttggccga attggccgcc tggtaccccg tgcagctctt 120

gaaaaaggag ttgaagtagt agctgtcaac gatcccttcc ttgatgtcga ctacatggta 180

tacttgttca aatttgactc tacccacggt cgctacaagg gatgtgtcaa cagtgatggc 240

aaaaacttag ttgttgatgg caaagtcatt tccgtacacc aagaaagaga cccagctgct 300

attccatggg gcaaagctgg tgcagattat gtagtagaat ctaccggagt gttcaccaca 360

attgaaaagg ccaagaaaca tcttgacggt ggtgctaaga aagtcatcat ctcagctcca 420

tctgctgatg ctccaatgta tgtatgtggt gttaacttgg atgcctacaa tccagctgat 480

cccgtaatct ctaacgcttc ttgcactacc aactgccttg ctccactcgc caaagtcatc 540

cacgacaact tcgaaatcgt tgaaggtttg atgaccaccg tacatgccac aaccgccaca 600

caaaaaactg tcgacggacc ctctggaaaa ttgtggcgtg acggtcgtgg tgccggacaa 660

aacatcatcc cagc 674

<210> 86
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 86
taatacgact cactataggg agagtacccc gtgcagctct tgaaa 45

<210> 87
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 87
taatacgact cactataggg agaggttgtg gcatgtacgg tggtc 45

<210> 88
<211> 538
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 88
taatacgact cactataggg agagtacccc gtgcagctct tgaaaaagga gttgaagtag 60

tagctgtcaa cgatcccttc cttgatgtcg actacatggt atacttgttc aaatttgact 120

ctacccacgg tcgctacaag ggatgtgtca acagtgatgg caaaaactta gttgttgatg 180

gcaaagtcat ttccgtacac caagaaagag acccagctgc tattccatgg ggcaaagctg 240

gtgcagatta tgtagtagaa tctaccggag tgttcaccac aattgaaaag gccaagaaac 300

atcttgacgg tggtgctaag aaagtcatca tctcagctcc atctgctgat gctccaatgt 360

atgtatgtgg tgttaacttg gatgcctaca atccagctga tcccgtaatc tctaacgctt 420

cttgcactac caactgcctt gctccactcg ccaaagtcat ccacgacaac ttcgaaatcg 480

ttgaaggttt gatgaccacc gtacatgcca caacctctcc ctatagtgag tcgtatta 538

<210> 89
<211> 551
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 89
atagaagttg aaccatctga tactattgag aatgtgaaag ctaagatcca agataaggaa 60

ggtatcccac cagaccagca aagattgatc tttgcaggta aacagctgga agatggtaga 120

accttgtctg actataacat ccagaaagag tccactcttc acttggtact gagattgaga 180

ggaggtatgc agatcttcgt caagacacta actggaaaga ccatcacttt ggaagttgaa 240

ccatctgata ccattgagaa tgtcaaagct aagatccaag ataaggaagg tatcccacca 300

gatcagcaaa gattgatctt tgcaggtaaa cagctagaag atggtagaac tttgtctgat 360

tataacatcc agaaagagtc cactcttcac ttggtactta gattgagagg aggtatgcac 420

attttcgtca agacattgac tggtaatacc atcacattag aagttgaacc atctgatact 480

attgagaatg tgaaagctaa gattcaagat aaggaaggta tcccaccaga tcagcaaaga 540

ttgatctttg c 551

<210> 90
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 90
taatacgact cactataggg agagtatccc accagaccag 40

<210> 91
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 91
taatacgact cactataggg agaatgtgca tacctcctct caatcta 47

<210> 92
<211> 407
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 92
taatacgact cactataggg agagtatccc accagaccag caaagattga tctttgcagg 60

taaacagctg gaagatggta gaaccttgtc tgactataac atccagaaag agtccactct 120

tcacttggta ctgagattga gaggaggtat gcagatcttc gtcaagacac taactggaaa 180

gaccatcact ttggaagttg aaccatctga taccattgag aatgtcaaag ctaagatcca 240

agataaggaa ggtatcccac cagatcagca aagattgatc tttgcaggta aacagctaga 300

agatggtaga actttgtctg attataacat ccagaaagag tccactcttc acttggtact 360

tagattgaga ggaggtatgc acattctccc tatactgagt cgtatta 407

<210> 93
<211> 401
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<220>
<221> misc_feature
<222> (369)..(369)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 93
gtaatgttca tgttttgtgt gtagaaaaac gctaaaactg tgtgcaggca catcctttcg 60

cgatgagtag acccaacaca aactgttttc aagtcttacc gaacaatagc agatggctat 120

cgacacaaga ttctggaatt tttcccaaac gtcacactga ctactatgta tttaatatgg 180

gaagacagga agtgttagtg gaaggatggt ggggaacaaa actgggatgg actggggttt 240

tggatggagt gaacctggcg cctggcaatg gttacagaat tgtagtcagt gataaaccat 300

attttgtaac agctgtgaaa ataacaaata aaacaactgt aagggctctc atgcattgtt 360

ctgagatana cggttatcct ctgcggagtc aaggaactga c 401

<210> 94
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 94
taatacgact cactataggg agatcgcgat gagtagaccc aacac 45

<210> 95
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 95
taatacgact cactataggg agaaacaatg catgagagcc cttaca 46

<210> 96
<211> 348
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 96
taatacgact cactataggg agacgcgatg agtagaccca acacaaactg ttttcaagtc 60

ttaccgaaca atagcagatg gctatcgaca caagattctg gaatttttcc caaacgtcac 120

actgactact atgtatttaa tatgggaaga caggaagtgt tagtggaagg atggtgggga 180

acaaaactgg gatggactgg ggttttggat ggagtgaacc tggcgcctgg caatggttac 240

agaattgtag tcagtgataa accatatttt gtaacagctg tgaaaataac aaataaaaca 300

actgtaaggg ctctcatgca ttgtttctcc ctatactgag tcgtatta 348

<210> 97
<211> 1168
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 97
acgctgacaa gctgactcta gcagatcacc gtcttcgata ccaagcggcc tgaattcgcg 60

tgaatcgtat ctcagtccat cgttggccaa gccggagtcc aaataggtaa tgcctgctcg 120

ggagttgtac tcgcctggaa cagggcatcc aacctgacgg tcagatgcca tcagacaaga 180

ctgttggagg aggagatgac agtttcaaca cattcttcag tgaaactggt gccggcaaac 240

atgtacctag agcagtattt gtagatttgg aaccaacagt agtagatgaa gtacgtaccg 300

gcacataccg tcaattgttc cacccagaac aactcatcac tggcaaagaa gatgccgcca 360

ataactacta gaggtcacta tacaattggt aaagaaatag ttgacttggt attggacaga 420

atccgtaaat tggctgatca atgccatagt caacagatag acgttccatc aacaaagaag 480

tgaaaccaga tccagtacca ccaccgaagg agtggaagat caagaaacct tgaagtccag 540

tacattgatc agccaattta cggattctgt ccaataccaa gtcaactatt tctttaccaa 600

ttgtatagtg acctctagta gttattggcg gcatcttctt tgccagtgat gagttgttct 660

gggtggaaca attgacggta tgtgccggta cgtacttcat ctactactgt tggttccaaa 720

tctacaaata ctgctctagg tacatgtttg ccggcaccag tttcactgaa gaatgtgttg 780

aaactgtcat ctcctcctcc aacagtcttg tctgatggca tctgaccgtc aggttggatg 840

ccctgttcca ggcgagtaca actcccgagc aggcattacc tatttggact ccggcttggc 900

caacgatgga ctgagatacg attcacgcat tttggttgat gagtttttaa cttttacacc 960

acaaatgaaa caaaattacg acagacgttc agattagcta gtaatgcagc ggatccgatc 1020

gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga 1080

ttatcatata atttctgttg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga 1140

cgttatttat gagatgggtt tttatgat 1168

<210> 98
<211> 2131
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 98

tcgcggcgac acacacccct ctaaacacgc tatcattggt cccacgcgcc gctagctagc 60

gatcgcgagc gagcgcccgc ccccccgccc gggaagctgc attactagct aatctgaacg 120

tctgtcgtaa ttttgtttca tttgtggtgt aaaagttaaa actcatcaac caaaatgcgt 180

gaatgtatct cagtccatgt tggccaagcc ggagtccaaa tcggtaatgc ctgctgggag 240

ttgtactgcc tggaacatgg catccaacct gacggtcaga tgccatcaga caagactgtt 300

ggaggaggag atgacagttt caacacattc ttcagtgaaa ctggtgccgg caaacatgta 360

cctagagcag tatttgtaga tttggaacca acagtagtag atgaagtacg taccggcaca 420

taccgtcaat tgttccaccc agaacaactc atcactggca aagaagatgc cgccaataac 480

tatgctagag gtcactatac aattggtaaa gaaatagttg acttggtatt ggacagaatc 540

cgtaaattgg ctgatcaatg tactggactt caaggtttct tgattttcca ctccttcggt 600

ggtggtactg gatctggttt cacttctttg ttgatggaac gtctatctgt tgactatggt 660

aaaaaatcaa aactggaatt cgccatctac ccagctcctc aagtatctac tgctgtagta 720

gaaccataca actccatctt gaccacccac accactcttg aacactcaga ctgtgccttt 780

atggtagata atgaagccat ctatgacatc tgcagacgta atctagacat cgagcgccca 840

acctacacca acttgaacag acttattggc caaatcgtat cctcaatcac agcttctcta 900

agattcgatg gtgctctaaa tgttgacttg acagaattcc aaactaactt ggttccttac 960

cctcgtattc acttccctct tgtcacctat gccccagtaa tttccgctga aaaggcttac 1020

catgaacaac tttccgtagc tgaaatcacc aatgcctgtt tcgaacctgc caaccagatg 1080

gtaaaatgtg atcccagaca tggtaaatac atggcttgct gtatgttgta cagaggggat 1140

gttgtaccaa aggatgtaaa tgctgctatt gcaaccatta agaccaaacg taccatccaa 1200

ttcgtagact ggtgtccaac tggtttcaaa gtaggtatca actaccaacc accaactgtt 1260

gtacctggag gtgatttggc taaagtacaa cgtgccgtat gcatgttgtc caacactaca 1320

gctattgctg aagcctgggc aagattggac cacaaattcg atcttatgta tgccaagaga 1380

gctttcgtcc actggtatgt aggagagggt atggaagaag gtgaattctc tgaagctcgt 1440

gaagatttgg ctgctttgga gaaagattat gaagaagttg gtatggactc cggagaaggt 1500

gagggtgaag gagctgaaga atattaaatt tgattccaaa catgacaaat cacttgtttt 1560

taagacaaaa aattcctttc aatttttta cacttttca ttacttttct gtgaaacgat 1620

tatttaaagt ctgatttaat ttaatacaga atttttacg agcaaaaaaa aaaaagggcg 1680

gcccccgatt gcgcatatag ctacattaaa gatcgtggcc tctgtctaga gactgactac 1740

aagtatccat gattaaacgg agactgcaaa cagtgtaatc tcggttatca ataaccatcc 1800

aatgaactag tgcatgctgt agtatcataa cacgaagtaa gcatcttcac ttgaggaatg 1860

tattatactg tgtgagccaa tatcagtatg tgacaacact aaatgagact ggccatagat 1920

aaaacctaca gcgcctttag gacgacttcc tatactagaa tccggtggaa aaccagttcc 1980

tcaaagcact gctatctgca ggcatctgtc taacgtatgc aaatcttggt ggtaaagacg 2040

caaaggtaaa tcttgttata tatattgctg atcaagcgta tgatgatatg aagaaaccta 2100

tgggcgaata catgagatac agggatgaaa g 2131

<210> 99
<211> 1720
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 99
gacacgggcc cgaatatccc cggccgctct ctacgatcaa cgcatcgaag agagcgttct 60

gtgttttcta gtaatagtta tttaatacat tttataaatc aaaatgaggg aaatcgttca 120

catccaagct ggacaatgcg gtaaccaaat tggagccaaa ttctgggaaa tcatctctga 180

tgaacacgga atcgacccca ccggagccta ccatggagac tctgacctcc aacttgaaag 240

aatcaatgtc tactacaacg aggcctccgg cggaaaatac gtaccccgcg ccatcctcgt 300

cgacttggaa cccggtacca tggattcagt aaggtcgggt cccttcggac aaatcttcag 360

accagacaac ttcgtgtttg gacagtctgg agctggaaac aactgggcca agggacatta 420

cacagaaggt gctgaattag ttgattcagt attagatgtt gtaaggaaag aagctgaatc 480

atgtgattgt ttacaaggat tccaactcac acactcactt ggaggtggta ctggatcagg 540

tatgggtacc ctccttatct caaaaatccg tgaagaatac ccagacagaa ttatgaacac 600

atactcagta gtcccctcac ccaaagtatc agataccgta gtagaaccat acaatgccac 660

actttcagta catcaattgg tagaaaacac agatgaaaca tactgtattg ataatgaagc 720

tctctatgac atttgcttca gaactttgaa actcacaaca cccacatatg gagacttaaa 780

ccatttggta tccctcacaa tgtccggtgt aaccacctgt cttaggttcc caggtcagtt 840

gaatgctgat cttagaaaat tggctgtcaa catggttccc ttcccccgtc tccacttctt 900

catgcccgga ttcgctccac tcacctcaag aggcagccaa caatacagag cgttgacagt 960

tccagagctc acacagcaaa tgtttgatgc caagaacatg atggcggctt gtgatcccag 1020

acacggaagg taccttacag tagctgcagt attcagaggt aggatgtcaa tgaaagaagt 1080

tgacgaacag atgctcaaca tccagaacaa gaacagcagc tacttcgtcg aatggatccc 1140

caacaacgtt aaaacagccg tttgtgatat cccaccaaga ggtctcaaga tgtctgccac 1200

tttcatcggc aactcaaccg ccatccaaga attgttcaaa cgtatctccg aacaatttac 1260

agctatgttc aggaggaaag ctttcttgca ttggtacacc ggagaaggta tggatgaaat 1320

ggaattcacg gaagcagaat ccaacatgaa cgacttggta tcagaatacc aacagtacca 1380

agaagccaca gctgacgaag atgccgaatt cgacgaagac caggaagccg aagtcgacga 1440

gaactaaatt tcatacgtta attttggatc tgaaatcaaa gctttataac ttttatattt 1500

gtctcctctc cttttatttt ttatttaagc atgtttttg tacagtctct acattcccgt 1560

ttgtaaattt cgaatacact acttaaatta ttccaagact gacttttgt tgcttgtgtt 1620

tctggaattt caggaagtgt ttagatattt aacatgtttt gcgaactgtt tttttatgaa 1680

taggcattaa aactgctgcc attacttata ctcagaggca 1720

<210> 100
<211> 1175
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 100
tgacaactga cacacgagaa gatacgacat ggcaagaaaa tctctctgat taccattctg 60

acttttctgc gggatcggat gaggataagg aagacgatga tttcgatgag aagaacgacg 120

ccgatttaag cagaaggagt cgaagaaaga tggaaaggaa agacgagaag gatcgtcctt 180

taccaccgtt actagccaga gttggcggca atattgaagt actcggtttt aatgccaggc 240

agcgtaaagc gttccttaat gctattatgc gctacggaat gccaccacaa gacgctttca 300

attcacagtg gctggtgaga gatcttcgag gaaaatctga gaagatattc aaggcttacg 360

tgtctctctt tatgaggcat ctttgcgaac ctggtgcaga taatgctgat acatttgcgg 420

acggtgtgcc gagggaagga ctgagtaggc aacatgtttt gacaaggatt ggtgtgatgt 480

cacttataag aaagaaggtt caggagttcg aacacatcaa cggcgagtat agcatgccgg 540

aagtaatcaa aaagagcatt atggatcaaa ataaaatcaa tgccgccggc accgccacca 600

caagcgaagc agaaacgcct aaaagtgcta ctaccagtac tagtgctacg ccagctacaa 660

gtgctgctcc cagtcccgct cccacacaag gagaagataa agataaggat aaagattccg 720

ttcagagtga cgaaaataaa gataaagaag tggttaataa aacggaaacc gaagatgaag 780

agaagaaaac gggagaatct tcaacagaaa agccgaaaac tgaaccggaa gaagtgaaag 840

aagcttctcc gaaaaccgaa attcccgaag ctagttccga agctgataaa tctgagatca 900

aatccgaagt cgatacctcg tctgtaacca gcgaggaaaa gaaagaagag aaagaggaag 960

aggccaaaaa ggaagaaccc gaagagacca aaatggaaat acaggaggag gaacttgtta 1020

aagaggagaa aaaagaagaa gaggatgata agaagaagga ggaaattaag aaagaggtgg 1080

aaaagaagga agaggatgac gttatggtta ttgatgatga taaagataag aaggacaaaa 1140

aggaaatcga tctcgaagcc aagaagcgtt tcatg 1175

<210> 101
<211> 1176
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 101
cccatgcggc cgcccatttt tattgagcaa attgttcaga aagttgctgg gcgtagtcgg 60

gaaaaacatt gtttaaatcc ctttaatttc ctctaagtcg aaagaaaaag gctcaaaatg 120

gctctcagcg acgcagatgt acaaaagcag atcaagcaca tgatggcttt cattgagcaa 180

gaagccaatg aaaaggccga ggaaattgat gcaaaggctg aagaagaatt caacatcgaa 240

aagggccgtc tggtccaaca acagaggctc aagattatgg agtactacga gaaaaaagag 300

aagcaagtag aactccagaa aaaaatccaa tcatcaaaca tgttgaacca ggcaagattg 360

aaggtattga aagtaaggga agaccatgta cgtgccgttt tggaagatgc tcgcaaacgt 420

cttggtgagg taaccagaga ttcaggcaaa tatacacaaa tcctggaaag tctcatcctc 480

caagggctct atcagctctt cgaaaaggac atcaccatta gagtacgccc tcaggacaga 540

gaattggtaa aatctatcat gcctaacgtc tcccaaaagt acaaggacat aaccggtaaa 600

gacgtaaatc taaaaatcga cgacgagagc cacctttctc aagaaaccac cggaggaatc 660

gaactgttgg ccttgagaaa caagatcaaa atcaacaata ctctggaagc ccgtcttgag 720

ctcatctcac aacaattgat tccccagatc cgtaatgctc tgttcggacg caacgtcaac 780

agaaaattca ctgattaagt atttttgga tactgtgtat tgcctgtatt ttatatagta 840

ttgtaaaaca ttgttggttg cttagacaga tcttcaaaaa ccttttaaac tactatgtat 900

atacgatata tataataaac cattcctttt tttgaagtat tttaaacagt taagtttgtt 960

gttaccctaa ttgtatcctt gtcaagcaga tatttttaa aatccttaga aaattattag 1020

gtttcagtta tactacctta ttttttttct caaatatatt catattttat gtttatatgt 1080

atataaaaaa attatttttt tcttgtgaga aaatcatcgc aataaaattt attgttagtc 1140

caacaaaaaa aaaatggtgg ccgctttgtt ttttat 1176

<210> 102
<211> 2410
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 102
cggacgcgtg ggggagaaac ataacatcca tccacaaata tgtcgaaagt aaggatcgga 60

gatgaagaga aggaagggca gtatggttat gtccatgctg tctcaggtcc agtcgttact 120

gctgagaaaa tgtctggttc tgctatgtac gaactggtac gtgtcggata ctatgagctg 180

gtaggagaaa tcattagatt ggaaggtgac atggctacta ttcaggtata cgaagaaaca 240

tcaggtgtaa ctgttggtga tccagtatta agaactggta aaccactttc agtagaactt 300

ggacctggta ttatgggttc cattttgat ggtatccaac gtccattgaa agacatttgt 360

gacgctactg atagtattta catccccaag ggtattaacg taccttcttt atcgagaaca 420

gcaaaatggg acttcaaccc aatcaacatc aagttgggat ctcacttaac tggaggtgat 480

atatatggtc tagttcatga aaacaccctt gtcaaacaca aaatgattct gcctcctaga 540

gctaagggta ctgtaaccta cattgcagaa ccaggaaact acactgttga tgaagtagta 600

ttggaaactg aatttgatgg tgatcgtacc aaatatacta tgttgcaagt atggcctgta 660

cgtcaagcaa ggccagtcag tgaaaaatta cctgccaacc atcctctgct tacaggacag 720

cgtgtacttg atgctctttt cccatgtgta cagggtggta ctactgccat tcccggagct 780

ttcggttgtg gaaaaactgt aatttcacaa tctctttcca aatattccaa ctctgatgtc 840

attatctacg tcggttgcgg agaaagaggt aacgaaatgt ctgaagtatt gagagatttc 900

cctgaattga ctgttgaaat tgacgggcac actgaatcta ttatgaaacg taccgcattg 960

gtcgccaaca catctaacat gcctgtagct gctcgtgaag cttctatcta tactggtatt 1020

actctttctg aatacttccg tgatatgggt tacaacgtat ctatgatggc tgactcgaca 1080

tcacgttggg ccgaagcttt gagagaaatt tcaggtcgtt tggctgaaat gcctgccgat 1140

tccggttatc cggcttactt aggtgcccgt ttggcttcct tctacgaacg tgctggtcgc 1200

gttaaatgtt taggtaatcc agacagagaa ggatccgttt caattgtagg agccgtatca 1260

cctcctggtg gtgatttctc agatcctgtt accactgcta ctcttggtat tgtacaggtg 1320

ttctggggtt tggacaagaa acttgcccaa cgtaagcact tcccttcagt agactggctt 1380

ggatcatatt ccaaatattt aagagcattg gacgactttt atgacaaaaa cttccaagag 1440

tttattcctc ttagaaccaa agttaaggaa attcttcagg aagaagatga tctagccgaa 1500

attgtgcagc tggtaggtaa agcatctctg gcagaaacgg acaaaatcac cttggaaatt 1560

gccaggcttc ttaaagaaga tttcttgcaa caaaactcat actcttctta tgacagattc 1620

tgtccattct ataaaactgt cggtatgttg agaaacatga tcggtttgta cgacatggcg 1680

agacacgctg tagaatcaac cgcacaatca gaaaataaga tcacttggaa cgtaataaga 1740

gattcaatga gtggaatttt atatcaactt agcagtatga aatttaagga tcccgtaaaa 1800

gatggtgaag ctaaaatcaa ggcagatttt gatcaattat atgaagatat tcagcaggcc 1860

ttcagaaact tagaagatta aatcttttta aggaaatttt cctattttgt tcatcagtgt 1920

aagtttaaaa atatagcgat atttatcaaa aagaataata aggcctctat ccctcacttc 1980

tgtgaatatt aatatggccg tactaaagat agtaactaaa gataggtttt ctctttttg 2040

atattatcct gtacaaaata aattatgtaa attgttgaat atgtgtatag ttttttgggg 2100

tgagggtaca gtgcttatta aatacttttt aaacattttt cccgccattc caattactat 2160

taagtttttt cgttttaata ctttttaaa tatacaggtg cttaatatcg tttatatttt 2220

cagtattact tggttttctt catgtaaatt gttttaaatt tttcttttac ccttttaatc 2280

ttgtatatta cattacccaa ttaaagttaa ttgtacagat taagataaac gagtatctta 2340

taacatctat tagattgtta gaatcaataa atgtagtgta attgttctgt tttgaacaaa 2400

taaatgcatc 2410

<210> 103
<211> 1575
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 103
atctgacagt ttctacagta tagttgcagt gttcagtgga aaatattcaa ttaagatatt 60

cctagcgttc agacgtgtgc tctgatttca tggtactaaa atggcagtag ttcaatcaaa 120

ttacattcaa aatatacctt cttttggatg tgtagaccaa cctgacaacg gctccaaaac 180

aacaagagaa tcattagtag aagtgtcttc atcacgtcca cgccaagaag actactcagt 240

atatgagaac agactggcat ctttcactaa ctggcccaac acccaagtgt caagagaatc 300

attagctcga gctggtttta tatatacagg tcaagatgac atcgttatct gccctatttg 360

taagatagag ggataccatt gggtatcagg agacaatcca atggatgatc atcgtgtttg 420

gaatcccaac tgccccttc ttaatagaag agataacatc gagcacgatc actctgtagg 480

ttctagagac acttgtggac tttttggcat agaattgtta ccaaattcag ttcctgaaga 540

taatacaagt aatttacaaa aattagggat ccaacctgga acaggtccac aaaatcaaga 600

caaaattacg ttagaaagcc ggttagcaac attccagggt tggccaaaga gcattaaaca 660

gaggccttct gagttagctg aggcgggatt ttattacaca ggagctgggg accaaactgt 720

gtgcttttat tgtggtgggg gattaaaaga ctgggatgaa ggagatgatc cttgggagca 780

acatgccctt tggtttagca aatgtgtgtt tctcaatttg aaaaagggca aagaattcat 840

cgatcaagta aagaggaagg ctgatccaca attttcaatt cctggaccta gcggtactca 900

agccaaagag gaaccgactg ctactgaatc ttcaagtgat aaacaaagtg aaacagtgaa 960

aacaaaatca gatagggaaa gtttcgcaac tgacacaact ttgtgcaaaa tttgctttaa 1020

aaacgaactt ggtgttgttt tcttgccttg tggacatatt gttgcttgtg tagattgtgc 1080

tgctgcacta aaaacatgtg ctgtatgccg aaaaccttta gaggccacag tcagagcgtt 1140

cctatcataa atttttattc tgttaatagt ttttcacatt tcatgtttca cacatactta 1200

gatctagtca agattgttag agttttggca aagaaattaa ataaaaattc ttttcataaa 1260

aatcatttct ttaatattac attagagaaa aattatattt ttatactgag tacaaatttg 1320

aacaagttat taattttaag ttacaaaata cgcttttata ggttaacaat tatcaaagcg 1380

cttaaatcta atagatacta cacaacatta aggactgcaa accatatctt tcacgaagta 1440

atccctacta gtgaccaatt gctcgctagg agcagatgca aattacacaa atttactata 1500

aatctgacat taaaacttag gtgtatgttt gtgtgtatgt tatgtattga tcataataat 1560

atagtaattt ataat 1575

<210> 104
<211> 1870
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 104
gtcgacccac gcgtccgaat ttgatggtga tcgtaccaaa tatactatgt tgcaagtatg 60

gcctgtacgt caagcaaggc cagtcagtga aaaattacct gccaaccatc ctctgcttac 120

aggacagcgt gtacttgatg ctcttttccc atgtgtacag ggtggtacta ctgccattcc 180

cggagctttc ggttgtggaa aaactgtaat ttcacaatct ctttccaaat attccaactc 240

tgatgtcatt atctacgtcg gttgcggaga aagaggtaac gaaatgtctg aagtattgag 300

agatttccct gaattgactg ttgaaattga cgggcacact gaatctatta tgaaacgtac 360

cgcattggtc gccaacacat ctaacatgcc tgtagctgct cgtgaagctt ctatctatac 420

tggtattact ctttctgaat acttccgtga tatgggttac aacgtatcta tgatggctga 480

ctcgacatca cgttgggccg aagctttgag agaaatttca ggtcgtttgg ctgaaatgcc 540

tgccgattcc ggttatccgg cttacttagg tgcccgtttg gcttccttct acgaacgtgc 600

tggtcgcgtt aaatgtttag gtaatccaga cagagaagga tccgtttcaa ttgtaggagc 660

cgtatcacct cctggtggtg atttctcaga tcctgttacc actgctactc ttggtattgt 720

acaggtgttc tggggtttgg acaagaaact tgcccaacgt aagcacttcc cttcagtaga 780

ctggcttgga tcatattcca aatatttaag agcattggac gacttttatg acaaaaactt 840

ccaagagttt attcctctta gaaccaaagt taaggaaatt cttcaggaag aagatgatct 900

agccgaaatt gtgcagctgg taggtaaagc atctctggca gaaacggaca aaatcacctt 960

ggaaattgcc aggcttctta aagaagattt cttgcaacaa aactcatact cttcttatga 1020

cagattctgt ccattctata aaactgtcgg tatgttgaga aacatgatcg gtttgtacga 1080

catggcgaga cacgctgtag aatcaaccgc acaatcagaa aataagatca cttggaacgt 1140

aataagagat tcaatgagtg gaattttata tcaacttagc agtatgaaat ttaaggatcc 1200

cgtaaaagat ggtgaagcta aaatcaaggc agattttgat caattatatg aagatattca 1260

gcaggccttc agaaacttag aagattaaat ctttttaagg aaattttcct attttgttca 1320

tcagtgtaag tttaaaaata tagcgatatt tatcaaaaag aataataagg cctctatccc 1380

tcacttctgt gaatattaat atggccgtac taaagatagt aactaaagat aggttttctc 1440

ttttttgata ttatcctgta caaaataaat tatgtaaatt gttgaatatg tgtatagttt 1500

ttttgggtga gggtacagtg cttattaaat actttttaaa catttttccc gccattccaa 1560

ttactattaa gttttttcgt tttaatactt ttttaaatat acaggtgctt aatatcgttt 1620

atattttcag tattacttgg ttttcttcat gtaaattgtt ttaaattttt cttttaccct 1680

tttaatcttg tatattacat tacccaatta aagttaattg tacagattaa gataaacgag 1740

tatcttataa catctattag attgttagaa tcaataaatg tagtgtaatt gttctgtttt 1800

gaacaaataa atgcatcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaggaaaaa aaaaaaaaaa 1860

gggcggccgc 1870

<210> 105
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 105
ctaatagatg ttataagata ctcg 24

<210> 106
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 106
cgagtatctt ataacatcta ttag 24

<210> 107
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 107
gtaatactga aaatataaac gat 23

<210> 108
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 108
atcgtttata ttttcagtat tac 23

<210> 109
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 109
agcactgtac cctcacccaa 20

<210> 110
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 110
ttgggtgagg gtacagtgct 20

<210> 111
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 111
gtgagggata gaggccttat t 21

<210> 112
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 112
aataaggcct ctatccctca c 21

<210> 113
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 113
aacttacact gatgaacaa 19

<210> 114
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 114
ttgttcatca gtgtaagtt 19

<210> 115
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 115
aggcctgctg aatatcttca 20

<210> 116
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 116
tgaagatatt cagcaggcct 20

<210> 117
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 117
ctgccttgat tttagcttca c 21

<210> 118
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 118
gtgaagctaa aatcaaggca g 21

<210> 119
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 119
gattgtgcgg ttgattctac 20

<210> 120
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 120
gtagaatcaa ccgcacaat 19

<210> 121
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 121
taatacgact cactataggg tacgtaagct tggatcctct aga 43

<210> 122
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 122
taatacgact cactataggg tgcaggtacc ggtccggaat tccc 44

<210> 123
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 123
taatacgact cactataggg cgcgtccgaa tttgatggtg a 41

<210> 124
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 124
taatacgact cactataggg gttacctctt tctccgcaac c 41

<210> 125
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 125
taatacgact cactataggg gaagtattga gagatttccc t 41

<210> 126
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 126
taatacgact cactataggg ggaatcggca ggcatttcag c 41

<210> 127
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 127
taatacgact cactataggg gcttacttag gtgcccgttt g 41

<210> 128
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 128
taatacgact cactataggg ataaaagtcg tccaatgctc 40

<210> 129
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 129
taatacgact cactataggg ccaagagttt attcctctta 40

<210> 130
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 130
taatacgact cactataggg gctatatttt taaacttaca c 41

<210> 131
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 131
taatacgact cactataggg gaataataag gcctctatcc 40

<210> 132
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 132
taatacgact cactataggg taaacgatat taagcacctg 40

<210> 133
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 133
taatacgact cactataggg acatttttcc cgccattcca 40

<210> 134
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 134
taatacgact cactataggg gatgcattta tttgttcaa 39

<210> 135
<211> 36
<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 135
gcgtagaatt cgttcaaaac agaacaatta cactac 36

<210> 136
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 136
taatacgact cactataggg gcgtagaatt cgttcaaaac agaacaatta cactac 56

<210> 137
<211> 53
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 137
ggccttaagc tagcgcaatt ggatcccatt tattgattct aacaatctaa tag 53

<210> 138
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 138
ggccttaagc tagcgcaatt ggatcc 26

<210> 139
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 139
gatggtgaag ctaaaatcaa ggcag 25

<210> 140
<211> 53
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 140
ctgccttgat tttagcttca ccatcggaaa ttttcctatt ttgttcatca gtg 53

<210> 141
<211> 608
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 141
gcgtagaatt cgttcaaaac agaacaatta cactacattt attgattcta acaatctaat 60

agatgttata gatactcgt ttatcttaat ctgtacaatt aactttaatt gggtaatgta 120

atatacaaga ttaaaagggt aaaagaaaaa tttaaaacaa tttacatgaa gaaaaccaag 180

taatactgaa aatataaacg atattaagca cctgtatatt taaaaaagta ttaaaacgaa 240

aaaacttaat agtaattgga atggcgggaa aaatgtttaa aaagtattta ataagcactg 300

taccctcacc caaaaaaact atacacatat tcaacaattt acataattta ttttgtacag 360

gataatatca aaaaagagaa aacctatctt tagttactat ctttagtacg gccatattaa 420

tattcacaga agtgagggat agaggcctta ttattctttt tgataaatat cgctatattt 480

ttaaacttac actgatgaac aaaataggaa aatttcctta aaaagattta atcttctaag 540

tttctgaagg cctgctgaat atcttcatat aattgatcaa aatctgcctt gattttagct 600

tcaccatc 608

<210> 142
<211> 533
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 142
ggccttaagc tagcgcaatt ggatcccatt tattgattct aacaatctaa tagatgttat 60

aagatactcg tttatcttaa tctgtacaat taactttaat tgggtaatgt aatatacaag 120

attaaaaggg taaaagaaaa atttaaaaca atttacatga agaaaaccaa gtaatactga 180

aaatataaac gatattaagc acctgtatat ttaaaaaagt attaaaacga aaaaacttaa 240

tagtaattgg aatggcggga aaaatgttta aaaagtattt aataagcact gtaccctcac 300

ccaaaaaaac tatacacata ttcaacaatt tacataattt attttgtaca ggataatatc 360

aaaaaagaga aaacctatct ttagttacta tctttagtac ggccatatta atattcacag 420

aagtgaggga tagaggcctt attattcttt ttgataaata tcgctatatt tttaaactta 480

cactgatgaa caaaatagga aaatttccga tggtgaagct aaaatcaagg cag 533

<210> 143
<211> 1114
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 143
cgtagaattc gttcaaaaca gaacaattac actacattta ttgattctaa caatctaata 60

gatgttataa gatactcgtt tatcttaatc tgtacaatta actttaattg ggtaatgtaa 120

tatacaagat taaaagggta aaagaaaaat ttaaaacaat ttacatgaag aaaaccaagt 180

aatactgaaa atataaacga tattaagcac ctgtatattt aaaaaagtat taaaacgaaa 240

aaacttaata gtaattggaa tggcgggaaa aatgtttaaa aagtatttaa taagcactgt 300

accctcaccc aaaaaaacta tacacatatt caacaattta cataatttat tttgtacagg 360

ataatatcaa aaaagagaaa acctatcttt agttactatc tttagtacgg ccatattaat 420

attcacagaa gtgagggata gaggccttat tattcttttt gataaatatc gctatatttt 480

taaacttaca ctgatgaaca aaataggaaa atttccttaa aaagatttaa tcttctaagt 540

ttctgaaggc ctgctgaata tcttcatata attgatcaaa atctgccttg attttagctt 600

caccatcgaa attttcctat tttgttcatc agtgtaagtt taaaaatata gcgatattta 660

tcaaaaagaa taataaggcc tctatccctc acttctgtga atattaatat ggccgtacta 720

aagatagtaa ctaaagatag gttttctctt ttttgatatt atcctgtaca aaataaatta 780

tgtaaattgt tgaatatgtg tatagttttt ttgggtgagg gtacagtgct tattaaatac 840

tttttaaaca tttttcccgc cattccaatt actattaagt tttttcgttt taatactttt 900

ttaaatatac aggtgcttaa tatcgtttat attttcagta ttacttggtt ttcttcatgt 960

aaattgtttt aaatttttct tttacccttt taatcttgta tattacatta cccaattaaa 1020

gttaattgta cagattaaga taaacgagta tcttataaca tctattagat tgttagaatc 1080

aataaatggg atccaattgc gctagcttaa ggcc 1114

<210> 144
<211> 1125
<212> DNA
<213> Leptinotarsa decemlineata

<400> 144
ggtgacatgg ccaccatcca ggtatatgaa gaaacttctg gagtaacggt gggagatcct 60

gtgttgcgta ccggtaaacc tctatctgtg gaacttgggc caggtattat gggttccatc 120

tttgatggta tccaacgtcc gctgaaagac atctgcgaca tgacggaaag tatctacatt 180

cccaagggtg tgaacgtgcc ttcactctcc agaactatca aatgggaatt caacccaatc 240

aacatcaagt tgggatccca cttgacaggt ggagatattt atggtatggt ccacgaaaac 300

acccttgtta agcacaaaat gatcctccca ccaaaatcta agggaacagt tacatacgtg 360

gcagaaccag gaaactatac cgttgatgaa gttgtattgg aaactgaatt tgatggagaa 420

aggtcaaaat acactatgtt acaagtctgg ccagttcgac aggcaagacc tgttagtgaa 480

aaactcccag ccaatcaccc gcttctcaca ggacagcgtg tattggactc tcttttccca 540

tgtgtgcaag gaggaaccac tgctattccc ggtgctttcg gttgtggtaa aactgtaatt 600

tcccagtcac tttccaagta ttccaactct gatgtcattg tgtatgtagg ttgtggagag 660

agaggtaatg agatgtctga agtattgaga gatttccctg aactgactgt ggaaattggt 720

ggtgagaccg aatctatcat gaaacgtacc gccttggttg caaacacctc caacatgcct 780

gtcgctgccc gtgaggcttc tatttatact ggtattaccc tgtctgaata tttccgtgat 840

atgggttaca acgtttctat gatggctgac tctacatcac gttgggctga agctttgaga 900

gaaatttcag gacgtttggc tgaaatgcct gctgattccg gttacccagc ctatttgggt 960

gctcgtcttg cctctttcta tgaacgtgct ggtcgcgtca aatgtttggg taaccctgac 1020

agagaaggat cggtttctat tgtaggagca gtatctccac ccggtggtga cttttcagat 1080

cccgttactt cagcaacttt aggtatcgta caggtgttct ggggt 1125

<210> 145
<211> 1125
<212> DNA
<213> Spodoptera frugiperda

<400> 145
ggtgacatgg ccaccatcca ggtatacgaa gaaacatcag gcgtaactgt aggtgacccc 60

gtgctgcgta ccggcaagcc cctgtccgta gagctcggac ctggtatcct cggctccatc 120

tttgacggta tccagcggcc actgaaggac atcaacgagc tcacacagtc catctacatc 180

cccaagggtg tcaacgtacc ctgccttgga cgtgatgtct cctgggaatt caacccccttg 240

aatgttaagg tcggctccca catcaccgga ggagacttgt acggtatcgt acacgagaac 300

acattggtta agcacaagat gttgatccca cccaaggcca agggtaccgt cacctacgtc 360

gcgccctccg gcaactacaa agtcactgac gtagtgttgg agacggagtt cgacggcgag 420

aaggagaagt acacgatgtt gcaagtatgg ccggtgcgcc agccccgccc cgtcactgag 480

aagctgcccg ccaaccaccc cctgctcacc ggacagagag tgctcgactc tctcttccct 540

tgtgtccagg gtggtaccac ggccatcccc ggcgccttcg gttgtggcaa gactgtcgtc 600

tcacaggctc tgtccaagta ctccaactct gacgtcatca tctacgtcgg atgcggtgaa 660

cgtggtaacg agatgtctga ggtactgcgt gacttccccg agctgacggt ggagatcgag 720

ggcatgaccg agtccatcat gaagcgtacc gcgctcgtcg ccaacacctc caacatgcct 780

gtagccgccc gagaggcttc catctacacc ggtatcaccc tctctgagta cttccgtgac 840

atgggttaca acgtgtccat gatggctgac tccacctctc gttgggccga ggctcttcgt 900

gagatctcag gtcgtctggc tgagatgcct gccgactccg gttaccccgc ctacctggga 960

gcccgtctgg cctcgttcta cgagcgtgcc ggacgcgtga agtgcctggg taaccccgac 1020

agggagggct ccgtgtccat cgtgggcgcc gtgtcgccgc ccggaggtga cttctccgac 1080

cccgtgacgg ccgccacgct gggtatcgtg caggtgttct ggggt 1125

<210> 146
<211> 1126
<212> DNA
<213> Agrotis ipsilon

<400> 146
ggtgacatgg ccaccatcca ggtatacgaa gaaacatcag gtgtaacagt gggcgacccc 60

gtactgcgta ctggcaagcc tctgtccgtg gaactgggtc ctggtatcct gggctccatc 120

tttgacggta tccagcgtcc tctgaaggac attaacgagc tcacacagtc catctacatc 180

cccaagggtg tgaacgtgcc cagtctatcc agggatatcg cctgggaatt tgagcccatg 240

aacctgaaga tcgggtccca catcactggc ggagacctgt acgccatcgt ccgcgagaac 300

accctggtga agcacaagat gttgatcccg cccaaggcca agggtaccgt cacatacatc 360

gcgcccgctg gcaactacca cgtcactgac gtggttctgg agacagagtt cgacggtgag 420

aaggagaagt acagcatgtt acaagtgtgg cccgtgaggc agccgcggcc ggtcgctgag 480

aagctccccg ccaaccatcc gctgctcacc gggcagaggg tactcgactc gctgttcccc 540

tgtgtgcagg gtggtacgac ggccatcccc ggagccttcg gttgcgggaa gactgtcatc 600

tcacaggcgt tgtccaagta ctccaactcc gatgtcatcg tctacgtcgg ttgcggagag 660

cgtggtaacg agatgtctga agtactgcgg gacttcccgg agctgaccgt agagatcggc 720

ggcgtcaccg agtccatcat gaagagaacc gcgctggtcg ccaacacatc caacatgcct 780

gtcgccgccc gagaggcttc catctatacc ggtatcactc tgtcggagta cttccgtgac 840

atgggctaca acgtgtccat gatggccgac tccacgtctc gttgggcgga ggccctccgt 900

gagatctctg gtcgtctggc cgagatgccg gcggactccg ggtacccggc ctacctggga 960

gcacgactgg cctccttcta cgagcgagcc ggacgagtca agtgtctggg taaccccgac 1020

agggaaggtt ccgtatccat cgtgggcgcc gtgtctcctc ccggcggaga cttctccgac 1080

cctgtgacgg ccgcgaccct gggtatcgtg caggtgttct ggggta 1126

<210> 147
<211> 1126
<212> DNA
<213> Helicoverpa zea

<400> 147
ggtgacacgg ccaccatcca ggtatacgag gaaacctcag gtgtaaccgt gggtgacccc 60

gtactccgta ccggcaagcc cctgtccgtg gagttgggcc ccggtatcct gggctccatc 120

tttgacggta tccagcgtcc cctgaaagac attaacgagc tcacacagtc catctacatc 180

cccaagggtg tgaacgtacc ctctctggct agggatgtca gctgggaatt cgttcccatg 240

aacgttaaga cgggctccca catcaccgga ggagacctgt acggtctggt gcacgagaac 300

acgctggtga agcaccgcat gctgatcccg cccaaggcca agggtaccgt cacatacatc 360

gcgcccgctg gcaactacaa agtcactgac gtagtgctgg agacggagtt cgacggcgag 420

agggagaagt acacgatgtt gcaggtgtgg ccggtgcgcc agccgcggcc cgtcaccgag 480

aagctccccg ccaaccatcc gctgctcacc ggacagaggg tgctcgactc actcttccct 540

tgcgtacagg gtggtacaac tgccatcccc ggagctttcg gttgcggcaa gactgtcatc 600

tcgcaggcgc tgtccaagta ctccaactcc gatgtcattg tgtacgtcgg gtgcggagag 660

cgtggtaacg agatgtccga agtactgcgt gacttccccg agctgacggt ggagatcgag 720

ggcgtgacgg agtccatcat gaagcgaact gccctcgtcg ccaacacctc caacatgcct 780

gtcgccgccc gagaggcttc catctacact ggtatcactc tatccgagta cttccgtgac 840

atgggttaca acgtgtccat gatggctgac tccacgtccc gttgggccga agccctgcgt 900

gagatctcgg gtcgcctggc ggagatgccg gccgactccg gctaccccgc atacctgggc 960

gctaggttag cttccttcta cgagagagcc ggacgcgtca agtgtctggg taaccccgac 1020

agggaaggtt ccgtatccat cgtgggtgcc gtatctcccc ccggaggtga cttctctgac 1080

cctgtaactg cggccacgct gggtattgtg caggtgttct ggggta 1126

<210> 148
<211> 1126
<212> DNA
<213> Ostrinia nubilalis

<400> 148
ggtgacacgg ccaccatcca ggtatacgaa gagacctcag gtgtgaccgt cggtgatccc 60

gtgctccgaa ccggcaagcc tctgtccgtc gagctgggtc cgggtatcct gggttccata 120

ttcgacggca tccagcgccc gctgaaggac atcaacgaac tgacgcagtc catctacatc 180

cccaagggag tcaacgtgcc ctgcctggcc aggaaccacg actgggagtt caacccgctt 240

aacgttaagg tcggctccca catcaccggc ggagacttgt acggtatcgt gcacgaaaat 300

accctggtga agcacaaaat gctgatgccg cccaaggcta aaggcaccat cacctacatc 360

gcgcctgccg gcaactacaa cgtcactgat gtggtgctgg agacagagtt tgacggcgaa 420

aagaactcct acaccatgtt gcaagtgtgg cccgtgcgcc agcccagacc ctgcactgag 480

aagctgcccg ccaaccaccc gctgctaact gggcagcgtg tgctggactc actcttcccc 540

tgtgtccagg gcggcaccac cgccatcccc ggcgccttcg gttgcggcaa gactgtcatc 600

tcgcaagcgc tgtccaagta ctccaactct gacgtcatcg tctacgtcgg ctgcggagag 660

cgtggtaacg agatgtctga ggtactgcga gacttccctg agctgagcgt ggagatcgac 720

ggcgtgacgg aatccatcat gaagcgcaca gcgctcgtgg ccaacacctc caacatgcct 780

gtggctgccc gtgaggcctc catctatact ggtatcaccc tatccgagta cttccgcgac 840

atgggttaca acgtgtcaat gatggcggat tccacatcgc gttgggcgga ggcgctgcgc 900

gagatctcgg gccgtctggc cgagatgccg gcggattccg gctacccggc ctacctgggc 960

gcccggctgg cctccttcta cgagcgagcg ggacgcgtga agtgtctcgg aaaccccgac 1020

agggaaggtt ccgtatccat cgtgggcgcc gtgtcgccac ccggaggaga cttctcggac 1080

ccggtgacgg cggcgaccct gggtatcgtg caggtgttct ggggta 1126

<210> 149
<211> 1125
<212> DNA
<213> Anthonomus grandis

<400> 149
ggtgacatgg ccaccatcca ggtatatgaa gaaacctcag gtgtaacagt aggcgaccct 60

gtcctaagaa cgggcaaacc tctgtcagta gaactgggac ctggtatcat gggttccatt 120

tttgatggta tccaacgtcc cttaaaagac attaacgact tgacccagtc catttacatc 180

cccaagggtg taaatgtgcc atgtctgtcc aggacagccc agtgggaatt caatcccgtc 240

cacatcaaga tgggttctca tttgaccgga ggcgacatct atggtatggt ccatgaaaac 300

actttggtga aacacaaaat gattttgcct ccaaaggcaa agggtactgt gacatatatc 360

gccgaggcag gcaactatac tgtggacgat gtggtacttg agaccgaatt cgacggagaa 420

cgcaccaaat acaccatgtt gcaagtgtgg cccgtacgtc aaccgagacc tgtgagcgaa 480

aaattgccgg ccaaccaccc actgctcacc ggacaacgtg tactcgattc acttttcccc 540

tgtgtgcaag gaggtaccac cgccatcccc ggcgctttcg gttgcggtaa aaccgtaatt 600

tcacaggcct tgtccaaata ttccaactcc gatgtcatca tttacgtcgg ttgcggtgaa 660

agaggtaacg aaatgtctga agtactacgt gacttcccgg agttaacggt cgaaatcgac 720

ggtgccaccg aatccatcat gaaacgtacc gctttggtgg cgaacacctc caacatgccc 780

gtggccgccc gtgaggcctc catttatacc ggaatcactt tgtccgagta tttccgtgat 840

atgggttaca acgtttcgat gatggccgac tccacctcac gttgggccga agccttaaga 900

gaaatttcag gtcgtttggc tgaaatgccc gccgattccg gttatcccgc ttacttggga 960

gcacgtttgg cctcgttcta cgaacgtgcc ggtcgcgtta agtgtttagg taatccggac 1020

agagagggct ccgtgtccat cgtaggcgca gtatcgccac ctggtggtga cttctcagat 1080

cccgtcactt ccgccacttt gggtatcgta caggtgttct ggggt 1125

<210> 150
<211> 1125
<212> DNA
<213> Tribolium castaneum

<400> 150
ggtgacatgg ccaccatcca ggtatacgaa gaaacttcag gtgttacggt gggtgatcca 60

gtcttacgaa ctggtaaacc cttgtcggtg gagctgggcc caggtattat gggttcgatt 120

tttgacggta tccagagacc gctgaaggac atcaacgagc tcacgcaaag tatttacatt 180

cctaagggtg ttaatgtgcc atcgttgtcg cgtacgacta agtgggagtt tgccccattg 240

aatatcaagt tggggtcaca tctgacaggc ggtgatattt acgggatcgt ccatgaaaac 300

actctcgtca agcataaaat gctgctgccg cccaaagcca aggggactgt cacatacgtc 360

gccgatcccg gaaattacac agtcgatgaa gtcgtcttgg agacggaatt cgacggcgag 420

aggaccaaat acaccatgtt gcaagtgtgg cctgtgcgtc agccccgccc tgtcagcgag 480

aaattgccag ccaatcaccc cctattaact ggtcaacgcg tactcgactc acttttcccg 540

tgcgtccaag ggggtaccac cgccattccc ggagctttcg gttgtggtaa gaccgtaatc 600

tcgcaatctc tctccaaata ttccaactct gacgttatca tttgcgtcgg ttgcggggag 660

cgtggtaacg aaatgtctga agtattgcgg gacttccccg aactgacagt cgaaatcgaa 720

ggccaaacag agtctatcat gaaacgtacc gctcttgtcg ccaacacctc taacatgcct 780

gtagccgccc gtgaggcttc aatttacacc ggtattacac tgtctgagta tttccgtgat 840

atgggttaca acgtgtcgat gatggccgat tccacctcgc gttgggccga agctttgaga 900

gaaatttccg gtcgtttagc tgaaatgccc gccgattctg ggtaccccgc gtatttgggg 960

gcccgtttgg cttcgtttta cgagcgtgca gggcgtgtta aatgcttggg taaccctgat 1020

cgtgaaggtt ccgtttctat tgtcggggcc gtatcgcccc ctggtggtga tttctctgat 1080

cccgtcacct cagctacctt gggtatcgta caggtgttct ggggt 1125

<210> 151
<211> 2860
<212> DNA
<213> Manduca sexta

<400> 151
ggttcgtctc atccatcttt ctcgtctcaa caggacacac agatagtaca aaatggcgag 60

caaaggcggt ttgaagacga tcgccaatga ggagaatgag gagaggttcg gatacgtgtt 120

cgccgtgtcc ggtcctgtcg taacagcgga gaagatgtcc ggatccgcta tgtacgagct 180

ggtgcgcgtc ggttacaacg agctggtggg agaaatcatc cgtcttgagg gtgacatggc 240

caccatccag gtatacgagg agacctcagg cgtcacagtc ggtgaccctg tgctgcgtac 300

cggcaagccc ttgtccgtgg aactcggccc cggtatcctg ggctccatct ttgacggtat 360

ccagcgtcca ctgaaggaca tcaacgagct cacacaatcc atctacatcc ccaagggtgt 420

gaacgtgccc tcgctcgcca gggaggttga ctgggaattc aacccctca atgttaaggt 480

cggctcccac atcaccggcg gagacctgta cggtatcgtg cacgagaaca cgctcgtgaa 540

gcacaagatg ttgatgccgc cgcgcgccaa gggtaccgtc acctacatcg cgcccgccgg 600

caactacaaa gtcactgatg tagtgttgga gacagagttc gacggcgaga aggcgcagta 660

cacgatgttg caggtgtggc ccgtgcgtca gccccgtccc gtcaccgaga agctccccgc 720

caaccacccg ctgctcactg gacagagagt actcgactcc ctcttcccct gtgtccaggg 780

cggtaccact gccatccccg gagccttcgg ttgcggcaaa actgtcatct cacaggcgct 840

gtccaagtac tccaactctg acgtcatcat ctacgtcggt tgcggagagc gtggtaacga 900

gatgtctgag gtactgcgtg acttccctga gctgacggtg gagatcgagg gtgtgacgga 960

gtccatcatg aagcgtaccg ccctcgtcgc caacacatcc aacatgcctg tcgctgcccg 1020

tgaggcttcc atctacacag gaatcaccct ttccgagtac ttccgtgaca tgggttacaa 1080

tgtgtccatg atggctgact cgacctcccg ttgggccgag gctcttcgtg agatctcagg 1140

tcgtctagct gagatgcctg ccgattccgg ttaccctgcg tacctgggag cccgtctggc 1200

ctccttctac gagcgtgccg gtagagtcaa gtgtctcgga aaccctgaca gggaaggttc 1260

ggtgtccatc gtgggtgccg tgtcgccgcc cggaggtgac ttctcggacc ccgtgacggc 1320

ggccacgctg ggtatcgtgc aggtgttctg gggtctcgac aagaaactcg cgcagaggaa 1380

gcacttcccc tccatcaact ggcttatctc ttacagcaag tacatgcgtg ctttggatga 1440

cttttatgag aagaactacc ccgaattcgt gccccttagg actaaggtca aggagatcct 1500

gcaggaggaa gaggacctgt cagaaatcgt gcagttggtc ggtaaagcct cgctcgccga 1560

gactgacaag atcaccctcg aggtcgccaa actgcttaaa gacgacttct tgcaacagaa 1620

cagctactcg tcatacgatc gattctgtcc gttctacaag accgtgggca tgcttaagaa 1680

catcatctcg ttctacgaca tgtcgcggca cgcggtggag tccacggccc agtccgacaa 1740

caaggtcacg tggaacgtga tccgcgacgc catgggcaac gtactctacc aactctcctc 1800

catgaagttc aaggacccag tgaaagacgg cgaggccaag atcaaggcag atttcgacca 1860

gctgttggag gatatgtccg ccgccttccg taacctcgag gactaagcac agccgtacta 1920

cagtacagta cagtagggag cgcccacgag ccgcgccgcg acatcctccg cagccgagag 1980

gacatcttta tcgacttgtt ttcatgttgt cattttttatt ataatttatt gattaatatg 2040

aggatatatt ttttcgtatt ctattcacgt ccggagcgtt ttgagacagt tttttcgagt 2100

ctggagtgtt ttgcatttta tcgatattat cgagtgtcgg gcgtcgttaa ggcggtgctg 2160

ttagcgaggt atgcgttatg acacacgcat atatcgtaat aacagcgttg tttaaacggg 2220

tctgtgcgca ggcgcagttc gtgggcggtc gtgttgttat agtaattatg tagtgttaaa 2280

tatattacaa catcgattcc agaggatggt gtcgcgggct agaactccga cagcgcgaaa 2340

gcctacaaag ggcgtggctt gtaaacggca caataaggcc gactaacaat tctccgttat 2400

ttgaaatagc agttcaaaca cagtcgtcac agtggcggta gtccgaatgt ttggacctgg 2460

gttggtgttt ataaagttcg cccaatctat tgtaaatata taacaggttc gctgttctag 2520

cccgcgggcc gttacggcgt ttagttgttt tatgaaatct atttatgtac tatatcgatc 2580

ggtaaaccgt gatttataat caaatatcct cttgcattcc acgttgttgt tagaaatata 2640

gaattcaaaa cgtttgttgt tttcgagagc tttttacgct taatatggat gttcattcag 2700

tattaatata atgcgtacga gtacgcagta acaatagtca gcactaatat gtctactcgc 2760

tgtttgaaat tctgtgacgt tacgtgttga gaaattatta taaataataa taaaatattg 2820

taaacaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2860

<210> 152
<211> 3097
<212> DNA
<213> Aedes aegypti

<400> 152
caggttggcc agtctttcag tcagtcagtc ttgtgatacc attttgcttc gctcggtgtg 60

tggagtttgc atttttccca tcccatctct ctcgacaact gcagcaccta agagcagaag 120

gaagcagagc aggaggaacg gatcgtaaca atgtccaccc tgaagaagat ctccgatgag 180

gaccgcgagt ccaaattcgg atatgtgttc gccgtatccg gtcctgtcgt cacggccgag 240

cggatgtccg gttcggctat gtacgagttg gtccgcgtcg gttactacga gctggtcggt 300

gagatcatcc gtttggaagg tgacatggcc accatccagg tatacgagga aacctccggt 360

gtcaccgtcg gcgatcccgt gctgcgtacc ggcaagcccc tctccgtcga actcggtcca 420

ggtattatgg gtagcatctt tgacggtatc cagcgtccac tgaaggacat taacgaactg 480

accagctcga tctacatccc cgaagggtgt gaacattccc tgcttgtccc gtacaggagg 540

ctggggattc aacccccttga acgtaaaggg ttgggctctc acatcaccgg aagagatctg 600

tacggtttgg tgcacgagaa taccctggtc aagcacaagc tgttggtccc gccacgcgcc 660

aagggtacag ttcgttacat tgctccaccc ggaaattaca ccgtcgacga catcattctg 720

gagacggaat tcgacggtga gatcaacaag tggtctatgt tgcaggtgtg gcccgtgcgt 780

cagccacgtc cagtgactga gaagttgccc gccaatcatc ctctgctgac tggtcagcgt 840

gtgttggatt cgctgttccc ttgtgtccag ggtggtacca ctgccatccc cggagctttc 900

ggttgcggta agactgtcat ctcgcaggcc ctgtccaagt actccaactc cgatgtcatt 960

atctacgtcg gttgcggaga acgtggtaac gaaatgtctg aagtattgcg tgatttccct 1020

gagctgtcgg ttgagattga cggtgttacg gagtccatca tgaagcgtac cgcgctggtt 1080

gccaacacct ccaacatgcc tgtcgctgct cgtgaagctt ccatctacac cggtattacc 1140

ttgtccgagt acttccgtga tatgggttac aacgtatcca tgatggctga ctcgacctct 1200

cgttgggccg aagctcttcg agaaatttcc ggtcgtctgg ctgagatgcc tgccgattcc 1260

ggttatcctg cctacctggg tgcacgtttg gcctccttct acgagcgtgc cggtcgtgtc 1320

aagtgtctcg gtaaccctga acgtgaaggt tcggtgtcca tcgtcggtgc cgtatcgccc 1380

cctggtggtg atttctccga tcccgtcaca tccgccaccc tcggtatcgt acaggtgttc 1440

tggggtctgg acaagaaact ggcccagcgt aagcatttcc cctcgatcaa ctggttgatc 1500

tcctacagca agtacatgcg cgcccttgat gacttctacg ataagaactt ccaggagttt 1560

gtacccactg cgtacaaggt taaggagatc ctgcaggagg aagaagattt gtccgaaatt 1620

gtgcagctgg tcggtaaggc atcgctggca gaaaccgata agatcaccct tgaggtagcc 1680

aagctgctca aggatgattt cctgcagcag aactcgtact cggcgtacga tcgattctgt 1740

ccgttctaca agacggtcgg tcgtatgctg cgaaacatga tcggattcta cgatatggct 1800

cgccacgccg tcgaaaccac cgcccagtcg gagaacaaga tcacctggaa cgtgatccgt 1860

gactcgatgg gcaacatcct gtaccagctg tcgtcgatga agttcaagga cccgggaagg 1920

atggcgaaga agatcaaggc cgatttcgac caactgtacg aagacctgca gcaggcgttc 1980

cgcaacctgg aagattaaat tctcccgcac attcgtggtc tcttcaatgc gaaattcttg 2040

aacagtttat tgtttcagta acatagcaaa gaaatgttcg tagcatagtg caaacaaaac 2100

atcaaaatga gaaacacgaa acacagcaaa agtgtagggc cctccttggc atcatgataa 2160

accaacaaca tccattaagt aaaatgcttc taggtcacca ttttacaggc gtatttaggt 2220

ttaaacattt atttacacaa attattgcaa gaaaaagatt aagagaacaa atctataaag 2280

cgagtgtaac atatacattt agaaacggcg aaacactaca acaactacag aaccacacgg 2340

cagaacagaa acaaatttta gtaggtaagt gatattgcaa gtgttgtccg acggcgtagg 2400

aaaaggttag cgaacggaat aacgttcaat cggaaattgt cttcgaaagt ttccgcttgc 2460

atgcgtgtct caaatgcgaa taaaacgtat aaacaatcgt ggtgaaactt aacatcagtg 2520

atgatataat caaaggggat taaaatgaaa cacgtggaca aaagatctat aaagaaaaac 2580

tctcagctag aatagttcaa gacgtggcga agcgtatcat aaatagaata atatgtaaac 2640

cacggttaat gggaaaataa gaagaaactt tcgattgagt atgttataga aacttatcca 2700

tgtatgatgt ataaatcgct aattaatcgt ataagaaata acagaacaag ttttattata 2760

ggtgtaagcc aatcaagttg ttatatcagt ttaaatatta tttagtgaat atagttttac 2820

ttttaatttt gtagtgtcgt ttttccatcg gtaggatcgg aaacgagaat cgatgattga 2880

ttgactgttg acaaatgaaa tgaaagttaa atttattatg ctttttttgtt tgtgtgaaca 2940

gaattgaaga gccgccgcgt cgtttcggtc aatgcaagcg accgacggct cgtatctgtc 3000

ctgtacattt ttgtcgatga gcagaaaata tatgagaata aaaccctcta aaaaattgca 3060

ttccgcgtaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 3097

<210> 153
<211> 2533
<212> DNA
<213> Drosophila melanogaster

<400> 153
cgaaaacacg cacacagact gcaagtgtgt tagataataa gtgcagcaca agtccacact 60

tgagtaaaat aatccctaaa aaagccgaat atcaattagt tttccaagga gcttgaaaaa 120

gtgcgtcgaa aaaacagaat aaagcaaaat gtccaacctt aagcgtttcg atgatgagga 180

gcgtgagtcc aaatatggac gtgtcttcgc tgtctccggt cctgtcgtca ccgccgaggc 240

catgtctgga tcagctatgt acgagttggt ccgcgtcggc tactacgagc tggtgggcga 300

gatcatccgt ctggagggtg acatggccac catccaggtg tacgaggaga cctctggcgt 360

aactgtcgga gatccggtgc tgcgtaccgg caagcctctt tccgtggagc tgggacccgg 420

tatcatgggc agcatctttg acggtatcca gcgtcccctg aaggacatta acgagctgac 480

cgaatccatc tacatcccca agggtgtgaa cgtgcccagt ttgtcccgcg tggccagctg 540

ggagttcaac cccctgaacg tcaaggtcgg ctcccacatc accggaggtg acctgtacgg 600

tctggtgcat gagaacactc tggtcaagca caagatgatt gtgaaccccc gcgccaaggg 660

aacagtgcgc tacatcgccc cctccggcaa ctacaaggtc gacgatgtcg tcctggagac 720

cgagttcgat ggagagatca ccaagcacac catgttgcag gtgtggccag tgcgtcagcc 780

acgtcccgtg accgagaagc tgcccgccaa ccacccccctg ctcaccggac agcgtgtgct 840

cgactcgctc ttcccctgtg tccagggcgg taccaccgcc attcccggag ctttcggttg 900

cggcaagact gtgatctcgc aggctctgtc caagtactcc aactccgatg tcatcatcta 960

cgtcggttgc ggtgagcgtg gtaacgagat gtctgaggta ctgcgtgact tccccgagct 1020

gtccgtggag atcgacggtg tcaccgagtc catcatgaag cgtaccgccc ttgtggccaa 1080

cacctccaac atgcctgtgg ctgctcgtga ggcctccatc tacactggta tcaccttgtc 1140

cgaatacttc cgtgatatgg gttacaacgt gtccatgatg gctgattcca cctcccgttg 1200

ggctgaggct cttcgtgaaa tttctggtcg tctcgctgag atgcctgccg attccggcta 1260

cccagcctac ttgggagccc gtctggcctc cttctacgag cgtgccggtc gcgttaagtg 1320

cttgggtaac cccgagcgcg agggatccgt gtccattgtc ggagctgtgt ctcctcctgg 1380

tggtgacttc tccgatcccg tgacctccgc cactctgggt atcgtgcagg tgttctgggg 1440

tctcgacaag aagttggccc agcgcaagca cttcccctcg atcaactggc tcatctccta 1500

ctcgaagtac atgcgtgctc tggatgactt ctatgacaag aacttccccg aattcgtgcc 1560

gctgcgtacc aaggtcaagg agatcctgca ggaggaggag gatctgtctg agatcgtgca 1620

actggtcggc aaggcctctc tggccgaaac cgacaagatc acgctggagg tggccaagct 1680

gctgaaggac gatttcctgc agcagaactc ctactcctcg tacgatcgct tctgcccctt 1740

ctacaagacc gtgggcatgt tgaggaacat catcgacttc tacgacatgg cccgtcactc 1800

cgtggagtct acggctcagt ctgagaacaa gatcacctgg aacgtgattc gtgaggcaat 1860

gggcaacatt atgtaccagc tgtcatccat gaagttcaag gaccccgtta aggatggtga 1920

ggccaagatc aaggctgact tcgagcagct gcacgaggac ctgcagcagg ccttcagaaa 1980

tctggaggac tagagaccgc gctggcccta cttttacact ctaatcttat atttgttata 2040

tagttaacgt ttaaaaatga aagcagtcaa aaaccatccg aaaaagccta atcaaacacc 2100

aacaattccg tgctgcattc gatgaaaaac aaaagtccaa caaataccac aacttcttgg 2160

tgcctgcgag agatgtaaac attccggcct gcggttaata ctttccccta accacgcccc 2220

ctccgccccc tgaagggcaa ctctaggcaa cagcaactac aacgtcctgc tatgtacttc 2280

catttacaac aacaacacca acatacactt gaataaaagt acacggacac tggcgcacac 2340

acaacacata cataaaagac acaaatacaa atgcatgcat aaatagtatt attgtttaat 2400

gaatggaaat tcttgtttat ttgtgaaaaa agtcatgttt tctccctgtt tgtttgttaa 2460

atttatgtaa atatttaaag tatgaaatat taaatgtacg aataaagtgc aacaacaaat 2520

acatttaatg taa 2533

<210> 154
<211> 603
<212> DNA
<213> Bombyx mori

<400> 154
atgagttccc tcaagctgca gaagaggctt gcagcctctg ttatgcgatg tggtaaaaag 60

aaggtgtggt tggatccaaa tgaaatcaat gagatcgcaa acaccaactc cagacagaac 120

atccgtaaga tgatcaagga tggtctcgtc atcaagaaac ctgtagcagt acactcccgc 180

gctcgtgtcc gcaaaaacac agaagcacgt agaaagggtc gtcactgtgg ctttggtaag 240

agaagaggta cagccaatgc gcgtatgcca cagaaggaac tatgggtaca aagacaaagg 300

gttttaagaa aattgctcct gaagtacaga actgccaaga agattgacag gcatctatac 360

cactcactct acatgaaggc gaagggtaat gtgttcaaga acaagcgtgt gctcatggag 420

tacatccaca ggaagaaggc tgagaaggcc aggacgaaga tgcttagcga ccaggctgag 480

gcccgccgca ataaagtgaa ggaggcacgc aagcgccgcg aggaacgtat tgccgccaag 540

aaggaggaac tgctgcagac cttcgctaga gaagacgaag ccgcgcttac cgctaagaag 600

taa 603

<210> 155
<211> 612
<212> DNA
<213> Drosophila melanogaster

<400> 155
atgagttctc taaagctcca gaagaggctc gcagcctccg tgctgcgatg cggcaagaag 60

aaggtctggt tggatcccaa tgaaatcaac gagatcgcta acacaaactc gcgtcagaac 120

attcgcaagc ttatcaagga tggtctgatc atcaagaagc ccgtcgtggt ccactcccgt 180

taccgtgtgc gcaaaaacac cgaggcccgc cgcaaggacc gtcactgcgg attcggaaag 240

cgtaagggta ctgcgaacgc ccgcatgcct accaagctgc tgtggatgca gcgccagccg 300

ttctgccgcc gcctgttgaa gaagtaccgc gacagcaaga agattgacag gcacctgtac 360

cacgacctgt acatgaagtg caagggtaac gtgttcaaga acaagcgcgt cctcatggag 420

tacatccaca agaagaaggc tgagaagcag cgcagcaaga tgctggctga tcaggccgag 480

gctcgccgac agaaggtgcg tgaggcccgc aagcgccgcg aggagcgtat tgccaccaag 540

aagcaggagc tcatcgccct gcatgctaag gaggacgaga tcgctgccaa ggccgccacc 600

gcgggtcact aa 612

<210> 156
<211> 567
<212> DNA
<213> Anopheles gambiae

<400> 156
atgcgatgcg gcaagaagaa ggtgtggttg gatcctaatg aaatcaacga gattggaaac 60

accaactcgc gacaaaacat tcgcaaactg atcaaggatg gtctgatcat caagaagccg 120

gtggtggtcc actcgcgtta ccgtgtgcgc aaaaacacga tcgctcgccg caagggtcgc 180

cactgcggtt atggtaagcg aaagggtacg gccaatgccc gtatgcccca gaagctgctc 240

tggatgaacc gtatgcgtgt gctgcgtcgt ctgctgaaga agtaccgtga ggcgaagaaa 300

atcgaccgtc acctgtacca cgacctgtac atgcgtgcga agggtaacgt gttcaagaac 360

aagcgtatcc tgatcgagca catccacaag aggaaggcgg agaaggcccg ctccaagatg 420

ctgagcgatc aggccgaagc caagcgtacc aaggttcgtg aggcccgtcg tcgtcgcgag 480

gaacgtattg ccaccaagcg ccaggagctt ctgcagacga tcgctaagga agaggagacc 540

gcgcagcatg ttgccgctac tggaaag 567

<210> 157
<211> 652
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 157
cacgttgaga ggtgcatttg cacgatgagt tccttaaaac ttcagaagag gctagcagcc 60

tctgttatgc gatgtggtaa aaagaaagta tggttggacc ctaatgaaat caacgaaatt 120

gccaacacta actcaagaca gaacatccgt aagttgataa aggatggtct tattattaag 180

aagcccgtag ctgtacattc ccgtgcccgt gttcgcaaaa acactgaagc ccgcaggaaa 240

ggaaggcact gcggttttgg taaaaggaag ggtactgcta atgcccgtac cccgcaaaag 300

gaattatgga ttcaacgcat gagagttttg cgtcgtctcc ttaaaaaata cagggaagct 360

aaaaaaattg acagacatct ataccactca ctctacatga aggccaaggg taacgtattc 420

aagaacaagc gtgtccttat ggaatacatc cacaagaaga aggcagagaa agcccgtgcc 480

aagatgttgg cagaccaggc caatgccaga aggatgaagg taaaacaggc tagagaaaga 540

cgtgaggaac gtatcgccac aaagaaacaa gaagttttgc agaactacat gagggaggat 600

gaagctgcgg ccactaagaa ataagttaat tgttttataa gatgactata tt 652

<210> 158
<211> 402
<212> DNA
<213> Anthonomus grandis

<400> 158
tgagatgtgg taagaagaag gtatggttgg accctaatga aattaacgag attgccaaca 60

ccaactcgag gcaaaacatc cgtaaattga tcaaggatgg tttgatcatt aagaaaccgg 120

tggcagtgca ctctagggct cgtgtccgta aaaacacaga agctcgcagg aagggaaggc 180

actgcggttt cggtaagagg aaaggtacag cgaacgctcg tatgcctcaa aaggaactat 240

ggatccaaag gatgcgtgtc ttgaggcgtc tcctgaaaaa atacagggaa gccaaaaaga 300

tcgacaggca tctgtaccac gccctgtaca tgaaggccaa gggtaacgtg ttcaagaaca 360

agagagtgtt gatggaatac atccacaaga agaaggctga ga 402

<210> 159
<211> 403
<212> DNA
<213> Tribolium castaneum

<400> 159
tgagatgcgg taagaagaag gtatggttag atccgaacga aatcaacgag atcgccaaca 60

cgaattcacg ccagaacatc cgcaaattga tcaaagatgg tctcatcatc aaaaagcccg 120

tcgctgtgca ctccagagcc cgcgtccgca agaacacgga ggcccgcagg aagggacgcc 180

attgcggctt cggcaagagg aaaggtacag ccaatgcgcg tatgccccag aaggagctct 240

ggatacagag gatgcgggtc ttgaggaggc tcctcaagaa gtatcgcgag gccaaaaaga 300

tcgacagaca tctttaccat tcgctgtata tgaaggccaa gggcaacgtc ttcaagaaca 360

agagggtcct tatggagtac atccacaaga ggaaggccga gaa 403

<210> 160
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Artificial sequence

<400> 160
ggtgacatgg ccaccatcca ggt 23

<210> 161
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 161
accccagaac acctgyacra tacc 24

<210> 162
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 162
ttaatacgac tcactatagg gagaccagtg tgctggaatt cgcc 44

<210> 163
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 163
ttaatacgac tcactatagg gagaggatat ctgcagaatt cgcc 44

<210> 164
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 164
ttaatacgac tcactatagg gagacctgtc cgtagagctc ggacc 45

<210> 165
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 165
ttaatacgac tcactatagg gagaggcacg ctcgtagaac gagg 44

<210> 166
<211> 22

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 166
tgmgatgygg yaaraagaar gt 22

<210> 167
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 167
tgmgatgygg yaaraagaar gtntgg 26

<210> 168
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 168
ttctcngcct tcytcytgtg gatgt 25

<210> 169
<211> 2713
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 169
cggacgcgtg agcggacgcg tgggcggacg cgtgggcgga cgcgtgggcg gacgcgtggg 60

cggacgcgtg ggcggacgcg tgggtggcaa cccacgcgtc cgctagttag tgctcgccgg 120

cgagcgcccg cgcccccgcc ccgaaagctg cattactagc taatctgaac gtctgtcgta 180

attttgtttc atttgtggtg taaaagttaa aactcatcaa ccaaaatgcg tgaatgtatc 240

tcagtccatg ttggccaagc cggagtccaa atcggtaatg cctgctggga gttgtactgc 300

ctggaacatg gcatccaacc tgacggtcag atgccatcag acaagactgt tggaggagga 360

gatgacagtt tcaacacatt cttcagtgaa actggtgccg gcaaacatgt acctagagca 420

gtatttgtag atttggaacc aacagtagta gatgaagtac gtaccggcac ataccgtcaa 480

ttgttccacc cagaacaact catcactggc aaagaagatg ccgccaataa ctatgctaga 540

ggtcactata caattggtaa agaaatagtt gacttggtat tggacagaat ccgtaaattg 600

gctgatcaat gtactggact tcaaggtttc ttgattttcc actccttcgg tggtggtact 660

ggatctggtt tcacttcttt gttgatggaa cgtctatctg ttgactatgg taaaaaatca 720

aaactggaat tcgccatcta cccagctcct caagtatcta ctgctgtagt agaaccatac 780

aactccatct tgaccaccca caccactctt gaacactcag actgtgcctt tatggtagat 840

aatgaagcca tctatgacat ctgcagacgt aatctagaca tcgagcgccc aacctacacc 900

aacttgaaca gacttattgg ccaaatcgta tcctcaatca cagcttctct aagattcgat 960

ggtgctctaa atgttgactt gacagaattc caaactaact tggttcctta ccctcgtatt 1020

cacttccctc ttgtcaccta tgccccagta atttccgctg aaaaggctta ccatgaacaa 1080

ctttccgtag ctgaaatcac caatgcctgt ttcgaacctg ccaaccagat ggtaaaatgt 1140

gatcccagac atggtaaata catggcttgc tgtatgttgt acagagggga tgttgtacca 1200

aaggatgtaa atgctgctat tgcaaccatt aagaccaaac gtaccatcca attcgtagac 1260

tggtgtccaa ctggtttcaa agtaggtatc aactaccaac caccaactgt tgtacctgga 1320

ggtgatttgg ctaaagtaca acgtgccgta tgcatgttgt ccaacactac agctattgct 1380

gaagcctggg caagattgga ccacaaattc gatcttatgt atgccaagag agctttcgtc 1440

cactggtatg taggagaggg tatggaagaa ggtgaattct ctgaagctcg tgaagatttg 1500

gctgcttttc ttatcatctc tatttttttt acgatcctta accgcataac accgtatcta 1560

tcattgtgaa attaggtgtg aaaggtgttt aaaaatgagg ttccttattc tacttgccgt 1620

attggctgta gctgtgaatg ctacatcaat ccaccaacaa tgggctacat ttaaggtaaa 1680

ccattccaag aagtacggac atcttaaaga agagcaagtt cgcttccaag ttttctctca 1740

aaatctccgc aaaattgaag aacacaatgc aagataccag aatggtgaag tgtccttcta 1800

cttgggggtt aatcagttcg cagatatgac ttcagaggaa ttcaaggcta tgcttgactc 1860

ccaactcatt cacaagccta agcgaaacat tacatcccgc tttgtagctg atcctcaatt 1920

gactgttcca gaatcaattg actggagaga aaaggggggca gttgctccca taagggacca 1980

agggcaatgc ggatcatgtt gggcatttag tgcagctggt gctcttgaag gacaaagatt 2040

tttaaagcag aacgtactag aagtactgag tacccaacag ttagtagatt gttccggtga 2100

ttacgacaat gaaggctgca atggtggttg gccccattgg gcatataact acattaaaga 2160

tcatggcctc tgtctagagt ctgattacaa gtatcaagga ttagacggtg actgcaaaca 2220

gtgtaatccg gttatcaaaa ccatcaatgg ctatgcatct gtagatcaaa ctgaagaagc 2280

acttaaggag gctgtaggta ctgctggccc aatatcagta tgtgtcaacg ctaattggga 2340

ctggcaactg tacagcgggg gtatccttga tagccaaagt tgtccaggcg gcattttaaa 2400

ccatgcagtt ttagctgttg gatatggttc agaaaatggt aaagactttt ggcttatcaa 2460

gaattcatgg gacacttatt ggggagaagc aggttatttg agattagtac gtggtacaaa 2520

ccagtgcggt atcaatgaag tggccgatta tcctctccta taattttaaa aattgtcatg 2580

ccttacagtt tatataatga aacatgaata aaaatattat aactttaaaa aaaaaaaaaa 2640

agggcggccg actttttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaca aaaaaaaata aaaaaaaaaa 2700

agggggggcc ccc 2713

<210> 170
<211> 1363
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 170
cccacccgtc ccgtggtcga gaaaagtact aatagtgata tctacgtttt tcgtttgttt 60

aaaatgtagt gacatttctg ttaaagtctt caaaaacgga gacgtagtta atttaaatat 120

taactcaatt tctgagttaa agcaaaatgt agtccacaga ggtgaactag acgacattga 180

aattgaggac caaaatgttc cagtagtacc aaacaatttg ctgaatggaa tcactgccac 240

ggaacttcac attattagat cccaagtaag agatgttgaa cctggtgcat tcgatggagc 300

ttctatggtt aacctaatgt tgtatgaaaa ccaaattgca agaataagaa aaggtatatt 360

taacaaaaac tcatttaata tacttgcttt gcagaataac gttatatcta atatagaaga 420

tgaagccttt gacggtacaa ccatcgcgat actggacttt ggttttaaca agatggaaaa 480

attgacttca aaaatgttcg ctggttcaaa tattacaaat cttaacttac aatcgaacct 540

aataagtaac atagaagatg gtacctttca gaaaatcgat aatttgaata aattagactt 600

aagcggtaac caattggaag ttattggaca cgtctttaga aacctgacaa acctaaatga 660

attgcacttg gatggaaacc gaatcaaaac acttgaacct ggatgctttg gtggttctgg 720

gatctactgg ctttattttg caggtaacca actgactcat attgtaaagg gagtgtttta 780

taaagtacca gtatccttat tggatttcac taataacaaa atttcaaaaa ttgataaagg 840

agccttagct ggtctttcaa cgctaacatt tgttcagtta tctaataaca atataggaga 900

tttgaagctg tccactcttg gcgatctcaa tactgcttta aatggtctat ctttgagtga 960

taacggcatt tcaaatatcg atattggagt gttcaaaaat actaaaatcg atatgttgga 1020

cttaagcaaa aaccatataa aatcaattaa aaaaggactg ttccagaatg ttaaaatgta 1080

cactattaat ttgagtgaaa atgaaattac tgaaatagag gaagatgctt ttggtgatat 1140

cgaggattta agtcacatag atgtgagctt gaacaaactt acagaagtta agaagagaat 1200

gttcagtcta ccattggatg aagttaattg gaagataatg taataactaa aatcgataat 1260

gatgcccctc gtgtccttcc gctgtcacgt cttcagataa aaataatcct attggctgca 1320

agaacaaagc ttaaaataat ggtgtattta ataataatgg aat 1363

<210> 171
<211> 1215
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 171

aaaagagtga ggaaacaggt taattataat gacggaggaa tgacaactga cacacgagaa 60

gatacgacat ggcaagaaaa tctctctgat taccattctg acttttctgc gggatcggat 120

gaggataagg aagacgatga tttcgatgag aagaacgacg ccgatttaag cagaaggagt 180

cgaagaaaga tggaaaggaa agacgagaag gatcgtcctt taccaccgtt actagccaga 240

gttggcggca atattgaagt actcggtttt aatgccaggc agcgtaaagc gttccttaat 300

gctattatgc gctacggaat gccaccacaa gacgctttca attcacagtg gctggtgaga 360

gatcttcgag gaaaatctga gaagatattc aaggcttacg tgtctctctt tatgaggcat 420

ctttgcgaac ctggtgcaga taatgctgat acatttgcgg acggtgtgcc gagggaagga 480

ctgagtaggc aacatgtttt gacaaggatt ggtgtgatgt cacttataag aaagaaggtt 540

caggagttcg aacacatcaa cggcgagtat agcatgccgg aagtaatcaa aaagagcatt 600

atggatcaaa ataaaatcaa tgccgccggc accgccacca caagcgaagc agaaacgcct 660

aaaagtgcta ctaccagtac tagtgctacg ccagctacaa gtgctgctcc cagtcccgct 720

cccacacaag gagaagataa agataaggat aaagattccg ttcagagtga cgaaaataaa 780

gataaagaag tggttaataa aacggaaacc gaagatgaag agaagaaaac gggagaatct 840

tcaacagaaa agccgaaaac tgaaccggaa gaagtgaaag aagcttctcc gaaaaccgaa 900

attcccgaag ctagttccga agctgataaa tctgagatca aatccgaagt cgatacctcg 960

tctgtaacca gcgaggaaaa gaaagaagag aaagaggaag aggccaaaaa ggaagaaccc 1020

gaagagacca aaatggaaat acaggaggag gaacttgtta aagaggagaa aaaagaagaa 1080

gaggatgata agaagaagga ggaaattaag aaagaggtgg aaaagaagga agaggatgac 1140

gttatggtta ttgatgatga taaagataag aaggacaaaa aggaaatcga tctcgaagcc 1200

aagaagcgtt tcatg 1215

<210> 172
<211> 3363
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 172
accacgcatc cgcccacgcg tccgcccacg cgtccgccca cgcgtccgat tgaattactc 60

taatattttt tttttatttt catttttat ttatttaata atttaaacta ttttaacttt 120

aattataaac caaaatattt taaaactaaa aaaactaatt taaaattcaa ttgaaaatga 180

taataaattt attttcttct ttcgacccta catctaattt taatttacca ataaactgat 240

taagaacagt attaggtcta ttaattattc catctagatt ttgattaatc ccctctcgtt 300

ataattattt atgaataaag attattataa cattacataa agaatttaaa gttttaattg 360

gaaattataa atcccaagga agaacattaa tttttatctc actatttaga ttaattttat 420

ttaataattt tcttggatta ttcccgtata tttttactag aacaagacat ataactttaa 480

cattaagatt agctttacca ttatgattga gatttataat ttatggatga ataaataata 540

ctattcatat attagctcat ttagttcctc aaggaactcc tccgatttta ataccattta 600

tagtttgtat tgaaacaatt agaaatgtaa ttcgacctgg aacattagca gtacgtttaa 660

ctgctaatat aatcgcagga cacttattaa taactctttt aggaaatact ggaccaataa 720

tatcaatcta tatattaaat attttaatta ttgtccaact tttactatta attttagaaa 780

cagcagtatc tataattcaa tcttatgtat ttgctgtttt aagaacacta tattctagag 840

aagtaaatta atgtcaaatc ataaaaatca tccttatcat ttagtagata ttagaccatg 900

acctttatta ggagctttta gagcaatatt aacaatatta ggaataatta aatgatttca 960

tttatataat aataatttac taataattgg attattaatt acaagattaa ttatatatca 1020

atgatgacga gatattgtac gagaaggaac ttatcaaggc cttcatacct ttagtagtta 1080

ctaaaggttt acgttgagga ataattttat ttattacttc agaagtatta ttttttatat 1140

catttttttg aggatttttt catagatcat tagcaccaac tattgaatta ggaatacttt 1200

gacctcctaa aggaattcaa gcctttaacc cattagaaat ccctttatta aatactttaa 1260

ttcttttaac ttcgggatta actgtaactt gagcccatca tagcctaata gaaaaataat 1320

ttttctcaag gacttcaagg attaattttt acagtaacat taggaattta ttttactatt 1380

ttacaaggat atgaatatat tgaatcacct tttgcaattt ctgattcaat ttatggatct 1440

tcatttttta tagcaacagg ttttcatgga ttacatgtaa ttattggaac aaccttctta 1500

ttaatttgtt taattcgcca ttatttaaat catttttcat cgacacatca ctttggtttt 1560

gaagcagcag cttgatactg acattttgta gatgtagtat gattattctt atatatttca 1620

atttactgat gaggtagatt gagtaaatac gtctaccgtt ctcctttaaa tgacgctatt 1680

tgtgctcctg aaagagagca aaagtgccca tggaatccga aggctgacag atctacctca 1740

attcatacaa cggtcaattg gcaagctcca cgtccaaaaa tactgccaaa tgccttgcac 1800

gcaattggta atactccatt gatcaagctt aacagaatac ctcagcaaga aggtttggaa 1860

tgtgatatat atgtaaaatg tgagttcttt aatcctggtg gatcagtaaa agatcgcatg 1920

gcaaacagaa tactgacaga tgccgagaat gaaggtatct taaaaccagg atgtaccatt 1980

atagagccgt cttcaggaaa tactggcatt ggtttggcta tggcagctgc tattaaagga 2040

tataggtgta taatcgtaat gtcagaaaaa atatccaaag agaaagaata cgtaatgaga 2100

gctttgggag ctgaagttat tagatgtcct gtcacagcta attcgttttc tccatatgga 2160

atgtttggta ctgtccatcg tttatcaaaa gaaattccca acagtattat ttttgatcag 2220

ttctctaatc ccggaaatcc actgactcac tacgatacta cagcagaaga aatttatgat 2280

caatgcgaca aaaaagtaga tatgataata atgggagctg gaacaggtgg taccgttacg 2340

ggtataggaa gaaaatttaa agagatttct cccaatacgg aaatcgtttg tgcagatcca 2400

attggatcat cttttgcttt accagaaatt ataaataaaa ctgacgttac tttctgggag 2460

atagaaggta tgggctacga tttcattccc tcaaccttag accgcaaagt cattgacact 2520

tggattaaag taggtgatga gaatgccctg ccaatggcaa gaaggttgat taaggatgaa 2580

ggccttttga ttggggctag cagtggagct atgatgtggg cggctattca agcagcgaaa 2640

gctaaaaatt atggccctgg taaaagggtt gtagttatgt taccagatag tattaggaac 2700

tacttaacaa agttcgtatg tgaccaatgg atggaagagc gaaatcttca gccttgtgta 2760

aatacaaaca accacccgtg gtggaattta aatgtctccc aattaaatct tcctgtacca 2820

caaactgtac cgataaattc ttccattgaa cagactttga atctaatgaa gaaacttgga 2880

cttaaccaga tacctgcatt ggatgatcaa gggggtgttg ttggagtact ttcaatgcag 2940

ctaattatta acaaacttac atctggtaat gctacactca atgacccaat agcagatgct 3000

atagaccgac tttatcccag agttgagaaa tctgctaata ttggactcgt ctcaagagta 3060

ttggaacgtg agccttattt ggtaattttg gatacacaag gtaaaggacc ttccaagata 3120

aataagcctg caggcgttgt aactccttta gattttctac agtttatcca gaagcagcat 3180

taaatataga ggagactaat atttccacca tttaacaaaa gtaatcacca taaagtgata 3240

aaataaataa tacctaatat aatagaaata ttagaaataa tagaaattat agattataat 3300

aaataaataa gtattataat caaaaaaaaa aaaaaaaggg gcggcgcccc ttttttttt 3360

ttt 3363

<210> 173
<211> 843
<212> DNA
<213> Diabrotica virgifera

<400> 173
ctcataatat tatgccaaaa atttaaaata gtatttcgag gagaaattct ttataaaaaa 60

aattgtatct ttctttatat ttctggtgat atttatgaaa aacacaccag caatatgttt 120

gctatatcga ggagatcaat agctgcttta acacaaatca gatcaaagac agacaaggcc 180

gttttggacg aaattattcg agtagatcat gctggagaat tgggagcaga tcgtatttat 240

gcaggccaga tgttcattct aggcagcact tcaaaagcac ctttgataag acatatgtgg 300

gaacaagaaa aacatcacaa agctacattc gaagatctaa ttagaaaaaa acgtgttaga 360

cctacagtaa tgactcctat ttggaatgtt gcaggcttcg ccttaggagc aggatcagca 420

ttgcttggag acaaagcagc tatggcgtgt actgtggctg tcgaaacagt aattgtagat 480

cattataatg accaactgag aactctgttg gaagatccag agtgtgataa agagcttgta 540

gaaactatta agaagtttag agacgaggaa caagaacatc atgaccatgg cattgatcag 600

ggagcaaagc agactccttt ttatgaagcg tttactaatg tcattaaagc tggatgcaaa 660

gcagctatag caatatcgaa agtagtttaa cttgtgttta tgtacatatt atgtagttga 720

ttgtgaaata tatgttgtta aatttgtaaa gtattgacag tattatatat ttttggatat 780

aaagttagtc ccactatgtg tacagaaaaa tctaataaaa taaaatcaat ttaaatacag 840

att 843

<210> 174
<211> 704
<212> DNA

<213> Diabrotica virgifera

<400> 174

aaagaccttg aagatcttct accatggcat gagaagcctg tgaagataca ggtcttagtt 60

ctagacatgt agagggacat aatctgtgtt atattttaga tcacaaaaga gtgcaattaa 120

ggctgttgtg tgatgagtac tagacaggaa gaaagagcag actcccagga tatctcgtgg 180

ttgagtctta tgatcaacaa tatacatatt ttgcatcaga atcttgatag atcaggctat 240

cttctaatta ttcttctatt ttttgttttt ttctcgagtt agctcagttt tttcctattt 300

tttttttggt acttttgcta gatatatttt acacatactc atttttatga gtcttaagtg 360

caatacgttg gtaacggaat actggttatt tgtcattcct tccttgtcgt acctaggttg 420

tttctcttta cttcaatagt tacaatgact atttgatttt tgattgtgtc aagctataca 480

agaaataaga gagtaatcag gagagagaaa gagagaaaag attgagtaat ctgtaagaca 540

tcaaaagatg aaaagaccta gaacatcttc tatcatagtt gtaagaggat gatgaaaggc 600

acaggtatta gttcaatcca gataaaaaat gaagtgttaa aagacataga agaaaaactt 660

ttgtgtacag tcgtacagta gacataggaa tacagcgaag atgc 704

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE INSECTOS EN PLANTAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona en general con el control genético de infestaciones de plagas en plantas, y en y sobre animales Más específicamente, la presente invención se relaciona con los métodos para modificar la expresión endógena de secuencias codificantes en las células o los tejidos de una plaga particular Más específicamente, la presente invención utiliza tecnología de ADN recombinante para reprimir o inhibir en forma post-transcripcional la expresión de una secuencia codificante deseada en las células de una plaga, por medio de la alimentación de la plaga con una o más moléculas de ácidos ribonucleicos (ARN) pequeñas de interferencia o de cadena doble, transcriptas a partir de la totalidad o una porción de una secuencia codificante deseada, con el fin de controlar la infestación Por consiguiente, la presente invención se relaciona con la inhibición con especificidad por la secuencia de la expresión de secuencias codificantes usando ARN de cadena doble (dsARN) o ARN pequeño de interferencia (siARN) para lograr los niveles deseados de control de plagas

También se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos novedosas aisladas y sustancialmente purificadas, incluyendo, sin limitaciones, secuencias de nucleótidos de ocurrencia natural y construcciones de ADN recombinantes para transcribir las moléculas de dsARN o siARN de la presente invención, que suprimen o inhiben la expresión de una secuencia codificante endógena o una secuencia codificante deseada en la plaga, al introducírselas en ella También se proporcionan plantas transgénicas que (a) contienen secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas de ácidos nucleicos aisladas y sustancialmente purificadas, y las construcciones de ADN recombinantes no naturales, para transcribir las moléculas de dsARN o siARN y controlar las

infestaciones de plagas en plantas, y (b) presentan resistencia y/o tolerancia mejorada a las infestaciones de plagas También se describen composiciones que contienen las secuencias de nucleótidos de dsARN de la presente invención para usar en aplicaciones tópicas sobre plantas o animales, o en el ambiente del animal, para lograr la eliminación o la reducción de la infestación de plagas

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El ambiente en el que viven los seres humanos está repleto de infestaciones de plagas. Las plagas, que incluyen insectos, arácnidos, crustáceos, hongos, bacterias, virus, nematodes, gusanos planos, gusanos redondos, gusanos ahusados, gusanos gancho, lombrices solitarias, tripanosomas, esquistosomas, moscas parásitas, pulgas, garrapatas, ácaros y piojos, y semejantes, invaden el ambiente humano, y se ha utilizado una multitud de medios para intentar controlar las infestaciones de estas plagas Se han proporcionado composiciones para controlar las infestaciones de plagas microscópicas, tales como bacterias, hongos y virus, bajo la forma de composiciones de antibióticos, composiciones antivirales y composiciones antifúngicas Las composiciones para controlar las infestaciones de plagas de mayor tamaño, tales como nematodes, gusanos planos, gusanos redondos, gusanos ahusados, fasciolas, lombrices solitarias, tripanosomas, esquistosomas y semejantes, típicamente han tomado la forma de composiciones químicas que pueden aplicarse a las superficies de los sustratos conocidos como susceptibles de ser infestados, o que pueden ser ingeridas por un animal infestado, bajo la forma de pellets, polvos, tabletas, pastas o cápsulas, y semejantes La presente invención proporciona un medio mejorado para controlar las infestaciones de plagas, en comparación con las composiciones conocidas en la técnica.

Los cultivos comerciales son comúnmente los blancos del ataque de los insectos Se han realizado progresos sustanciales en las últimas décadas, dirigidos al desarrollo de métodos y composiciones más eficientes para controlar las infestaciones de insectos en plantas Los plaguicidas químicos han sido muy efectivos para erradicar infestaciones de plagas Sin embargo, existen varias desventajas asociadas con el uso de agentes plaguicidas químicos Los agentes plaguicidas químicos no son selectivos Las aplicaciones de plaguicidas químicos están dirigidas al control de plagas de invertebrados que son dañinos para varios cultivos y otras plantas Sin embargo, debido a la carencia de selectividad, los agentes plaguicidas químicos ejercen sus efectos también sobre fauna distinta del blanco, comúnmente esterilizando efectivamente un campo por el período de tiempo durante el cual se aplican los agentes plaguicidas. Los agentes plaguicidas químicos persisten en el ambiente, y generalmente se metabolizan lentamente, si se metabolizan en grado alguno. Se acumulan en la cadena alimenticia, y particularmente en las especies depredadoras superiores La acumulación de estos agentes plaguicidas químicos resulta en el desarrollo de resistencia a los agentes, y en especies más arriba en la cadena evolutiva, éstos actúan como mutágenos y/o carcinógenos, que comúnmente causan modificaciones genéticas irreversibles y perjudiciales. Por consiguiente, desde hace tiempo existe la necesidad de métodos no perjudiciales para el ambiente que permitan controlar o erradicar las infestaciones de insectos sobre o dentro de plantas, es decir, métodos que sean selectivos, inertes para el ambiente, no persistentes y biodegradables, y que se ajusten en los esquemas de manejo de resistencia de plagas.

Las composiciones que incluyen bacterias *Bacillus thuringiensis* (B.t) han estado disponibles comercialmente, y se las ha usado como insecticidas seguros y aceptables por más de treinta años El efecto insecticida de las

bacterias Bt es el resultado de proteínas que son producidas exclusivamente por estas bacterias, que no persisten en el ambiente, son altamente selectivas respecto de la especie blanco afectada, ejercen sus efectos al ser ingeridas por el insecto plaga, y de las que se han demostrado que no son dañinas para las plantas y otros organismos distintos del blanco, incluyendo los seres humanos También existen plantas transgénicas que contienen uno o más que codifican proteínas insecticidas B.t disponibles en la técnica, y son marcadamente eficientes para controlar la infestación de insectos plaga Un resultado sustancial del uso de plantas recombinantes que expresan proteínas insecticidas Bt es una disminución marcada en la cantidad de agentes plaguicidas químicos que se aplican al ambiente para controlar la infestación de plagas en plantas de cultivo, en áreas donde se usan estos cultivos transgénicos La disminución en la aplicación de agentes plaguicidas químicos ha resultado en suelos y aguas más limpias dentro de los canales, los ríos, los charcos y los lagos. Además de estos beneficios ambientales, se ha observado un incremento notable en la cantidad de insectos beneficiosos en los campos de cultivo donde se desarrollan cultivos transgénicos resistentes a insectos, debido a la disminución en el uso de agentes insecticidas químicos

El uso adventicio de plantas recombinantes que expresan una toxina proteica cristalina insecticida ha incrementado la preocupación sobre el desarrollo espontáneo de resistencia a la toxina en la población de insectos plaga Un medio para demorar o eliminar la aparición de resistencia en la población de la plaga consiste en combinar la toxina recombinante con un segundo medio para controlar las plagas, donde el segundo medio ejerce sus efectos a través de un modo de acción diferente, en comparación con la toxina recombinante Un medio para desplegar dos o más toxinas consistiría en incorporar un tratamiento para semillas que contuviera una composición insecticida efectiva a dosis muy bajas, que perfundiera hacia la tierra o hacia

las plantas recombinantes en crecimiento después de que brotaran Se ha demostrado que este medio es efectivo y económico, pero presenta las desventajas de someter el ambiente a un plaguicida químico, que podría acumularse en la cadena alimenticia y persistir en el ambiente Otro medio consistiría en aplicar una planta recombinante que expresara al menos dos toxinas insecticidas diferentes, donde cada toxina sería tóxica para el mismo insecto plaga, y donde cada toxina ejercería sus efectos a través de un modo de acción diferente En el corto plazo, este segundo abordaje es más efectivo respecto del costo y presenta más probabilidades de demorar el inicio del desarrollo de resistencia en la población de plagas Sin embargo, puede haber al menos dos desventajas también en este abordaje Una desventaja es que cualquier desarrollo de resistencia a una de las toxinas insecticidas aplicadas al ambiente de la plaga inmediatamente incrementa la probabilidad de que pueda desarrollarse resistencia antes de lo anticipado a una segunda o aún una tercera toxina. También existe una cantidad limitada de toxinas proteicas cristalinas insecticidas que son tóxicas para el mismo insecto plaga disponibles para su uso, que, cuando se combinaran con otra proteína insecticida, estarían dentro del alcance definido de sus efectos, a través de un modo de acción diferente que las toxinas usadas en la actualidad. Por consiguiente, se necesitan composiciones y métodos adicionales para controlar las infestaciones de plagas, y en particular, métodos y composiciones para usar en la demora o la minimización del desarrollo de resistencia a los agentes de control de insectos plaga actuales

Los agentes plaguicidas químicos típicamente ejercen sus efectos inhibiendo una o más proteínas dentro del insecto plaga, uniéndose irreversiblemente a un sitio activo dentro de una proteína particular, inhibiendo la acción de la proteína sobre un sustrato de ocurrencia natural, o envenenando una vía de gradiente respiratorio o químico Los métodos y las

composiciones recombinantes típicamente han sido dirigidos a sistemas de membranas celulares que producen proteínas que, al ser ingeridas por una plaga, introducen poros que resultan en la pérdida de gradientes químicos o de otro tipo a lo largo de las membranas celulares alteradas. A diferencia de las composiciones que ejercen sus efectos directamente sobre las proteínas que participan en mecanismos de transcripción o traducción, no se ha descripto ningún método para controlar las infestaciones de plagas mediante la inhibición de la producción de proteínas esenciales en el insecto plaga a través de interferencia mediada por ARN, proporcionando una o más moléculas de ARN de cadena doble en la dieta de la plaga

También se han descripto métodos y composiciones antisentido en la técnica, y se cree que ejercen sus efectos a través de la síntesis de una molécula de ARN de cadena simple que, en teoría, hibridiza *in vivo* con una molécula de ARN en el sentido del marco de lectura sustancialmente complementaria Se cree que los métodos antisentido funcionan prácticamente del mismo modo que los métodos de interferencia mediada por ARN de cadena doble, excepto que la efectividad de la respuesta antisentido es comúnmente sustancialmente menos deseable, intermitente o no evidente en lo absoluto. Además, nunca se ha presentado un informe en el que se contemple el abordaje antisentido como un medio para suprimir la expresión de un gen, en una célula remota respecto de la célula o el sistema biológico en el que se expresara la secuencia antisentido La tecnología antisentido ha sido aplicada solamente como un medio para lograr la interferencia con especificidad por genes de la expresión dentro de la célula o el sistema biológico en el que se expresa la secuencia antisentido La tecnología antisentido ha resultado difícil de emplear en muchos sistemas debido a tres razones principales Primero, la secuencia antisentido expresada en las células transformadas es inestable Segundo, la inestabilidad de la secuencia antisentido expresada en las células

transformadas genera una dificultad en la administración de la secuencia al huésped, el tipo celular o el sistema biológico remoto respecto de la célula transgénica Tercero, las dificultades halladas con la inestabilidad y la administración de la secuencia antisentido generan dificultades al intentar proporcionar una dosis dentro de la célula recombinante que expresa la secuencia antisentido, que puede modular efectivamente el nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos en el sentido del marco de lectura deseada

El fenómeno de silenciamiento inducido por ARN de cadena doble (dsARN) ha sido conocido por una cantidad de años en sistemas vegetales Una forma de silenciamiento inducido por dsARN es conocida como co-supresión y como silenciamiento inducido por virus (VIGS), y se revisa en Matzke et al (Adv Genet., 2002, 46 235-275) Los efectos de la co-supresión y la VIGS en sistemas vegetales recombinantes han podido ser observados, pero no explicados, ya que se ha identificado el dsARN en sistemas animales como el desencadenante para la inducción del mecanismo evolutivo conservado de supresión genética Guo et al observaron primero que el uso de ARN en el sentido del marco de lectura como control era efectivo como ARN antisentido en el silenciamiento específico de un gen deseado en *C. elegans* (Guo et al., 1995, Cell *81* 611-620) Fire et al sospecharon que las preparaciones de ARN de cadena simple usadas por Guo et al Estaban contaminadas con dsARN, y subsiguientemente demostraron que el dsARN era un desencadenante mucho más potente que el ARN de cadena simple para lograr un silenciamiento genético específico. Las observaciones de Fire et al distinguieron el atributo físico de la supresión de ARN de cadena doble de la supresión antisentido (Fire et al , 1998, Nature *391* 806-811) Se cree que los efectos de silenciamiento genético post-transcripcional observados en plantas (Jorgensen, 1990, Trends Biotechnol 8 340-344) y el efecto de prevención forzada en hongos (Romano et al , 1992, Mol Microbiol 6 3343-3353; Bernstein et al , 2001, RNA 7·1509-

1521) usando ARN de cadena simple es el resultado de la contaminación de las muestras con secuencias de ARN de cadena doble (Dykxhoorn et al , 2003, Nature Reviews 4.457-467, Hannon et al , 2002, Nature 418·244-251) Sin embargo, ahora está claro que la inhibición de la expresión genética mediada por ARN de cadena doble, la co-supresión y el silenciamiento genético mediado por virus son desencadenados por el dsARN y operan a través de mecanismos similares (Stevenson, 2003, Nature Reviews 3 851-858, Bernstein et al , 2001, RNA 7.1509-1521)

La falta de comprensión de los mecanismos específicos que participan en estos fenómenos ha conducido a la existencia de pocos mejoramientos en las tecnologías para modular el nivel de expresión genética dentro de una célula, un tejido o un organismo, y en particular, a la falta de tecnologías desarrolladas para demorar, reprimir o reducir de otro modo la expresión de genes específicos usando tecnología de ADN recombinante. Además, como consecuencia de la falta de predictibilidad de estos abordajes, no existe ningún medio viable desde el punto de vista comercial para modular el nivel de expresión de un gen específico en un organismo eucariota o procariota.

Se ha demostrado con anterioridad la inhibición mediada por ARN de cadena doble de genes específicos en varias plagas. Se han evaluado los abordajes mediados por dsARN para el control genético en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Tabara et al , 1998, Science 282·430-431) Tabara et. al. describen un método para administrar dsARN, que comprende generar insectos transgénicos que expresan moléculas de ARN de cadena doble, o inyectar soluciones de dsARN en el cuerpo del insecto o dentro de la cavidad del huevo, antes o durante el desarrollo embrionario. Los investigadores han demostrado con anterioridad que puede efectuarse la supresión genética mediada por ARN de cadena doble en nematodes, alimentando o humedeciendo los nematodes en soluciones que contienen moléculas de ARN

pequeñas de interferencia o de cadena doble, e inyectando moléculas de dsARN. Rajagopal et. al. describieron intentos fallidos de suprimir un gen endógeno en larvas del insecto *Spodoptera litura*, que comprendieron alimentar o humedecer larvas neonatas en soluciones que contenían dsARN específico para el gen blanco, donde no se logró la supresión después de inyectar larvas de 5º estadío con dsARN en hemolinfa (J Biol Chem , 2002, 277.46849-46851) De forma similar, Mesa et al. (US 2003/0150017) describieron anticipadamente un locus preferido para inhibir larvas del lepidóptero *Helicoverpa armigera*, usando dsARN administrado a las larvas a través de la ingestión de una planta transformada para producir el dsARN Se cree que sería poco práctico proporcionar moléculas de dsARN en la dieta de la mayor parte de las especies de invertebrados plaga, o inyectar composiciones que contuvieran dsARN en los cuerpos de los invertebrados plaga El método que comprende proporcionar moléculas de dsARN en la dieta de los invertebrados plaga no es práctico debido a que las moléculas de ARN, aún las moléculas de ARN de cadena doble estabilizadas, son efectivamente muy inestables en ambientes ligeramente alcalinos o ácidos, tales como aquellos hallados en los tractos digestivos de la mayor parte de los invertebrados plaga, y son fácilmente degradados por las nucleasas en el ambiente Por consiguiente, es improbable que la alimentación de larvas de lepidópteros con dsARN, donde el pH del tracto digestivo está en el rango alcalino extremo, resulte en la supresión de cualquier gen dentro de las células de las larvas. Tampoco será práctico formular composiciones que contengan moléculas de dsARN, tales como bacterias recombinantes que expresaran estas moléculas de dsARN, como una fuente de alimentos para nematodes que pudiera aplicarse a grandes extensiones de tierra, con el fin de controlar las infestaciones de invertebrados plaga en plantas de cultivo

Por consiguiente, existe la necesidad de mejores métodos para modular la expresión genética, que comprendan la represión, la demora o la reducción de otro modo de la expresión genética dentro de un invertebrado plaga particular, con el propósito de controlar las infestaciones de plagas o introducir caracteres fenotípicos

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención, en una realización, comprende un método para inhibir la expresión de un gen blanco en un invertebrado plaga Específicamente, la presente invención comprende un método para modular o inhibir la expresión de uno o más genes blancos en un invertebrado plaga, en particular, en la oruga de la raíz de maíz occidental (WCR, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) y semejantes, que provoca la interrupción de la alimentación, el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y la infectividad, y eventualmente resulta en la muerte del insecto El método comprende la introducción de ARN de cadena doble (dsARN) parcial o completamente estabilizado, o sus formas modificadas, tales como las secuencias de ARN pequeñas de interferencia (siARN), en las células o en el ambiente extracelular, tal como el mesenterón, dentro del cuerpo de un invertebrado plaga, donde el dsARN o el siARN entra en las células e inhibe la expresión de al menos uno o más genes blanco, y donde la inhibición de uno o más genes blanco ejerce un efecto perjudicial sobre el invertebrado plaga. Específicamente, se contempla que los métodos y las composiciones de la presente invención puedan ser útiles para limitar o eliminar las infestaciones de invertebrados plaga en o sobre cualquier huésped de la plaga, simbionte de la plaga, o ambiente preferido por la plaga, proporcionando una o más composiciones que comprendan moléculas de dsARN en la dieta de la plaga, siempre y cuando el pH en el sistema digestivo de la plaga esté en el rango de entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente

9,5, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9, entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8, y aproximadamente pH 7,0

La presente solicitud describe un ejemplo de listado de secuencias que contiene las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la oruga de la raíz de maíz occidental (WCR, *Diabrotica virgifera*), como se indica en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y de otros insectos coleópteros, incluyendo el escarabajo de la papa de Colorado (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*) y el escarabajo rojo de la harina (RFB, *Tribolium castaneum*), de insectos lepidópteros, incluyendo el taladro del maíz europeo (ECB, *Ostrinia nubilalis*), la oruga cortadora negra (BCW, *Agrotis ipsilon*), la oruga de la mazorca de maíz (CEW, *Helicoverpa zea*), la oruga marchadora de otoño (FAW, *Spodoptera frugiperda*), el gorgojo de los copos de algodón (BWV, *Anthonomus grandis*), el gusano de seda (*Bombyx mori*) y *Manduca sexta*, y de insectos dípteros, incluyendo *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* y *Aedes aegypti*, como se indica en SEQ ID Nº 144 a SEQ ID Nº 159 Se incluye el listado de secuencias junto con la copia en papel de esta solicitud en un diskette CD-ROM.

La forma que puede ser leída por una computadora del archivo correspondiente al listado de secuencias contiene la información del listado de secuencias de las secuencias de oruga de la raíz de maíz Unigene, secuencias EST, secuencias de sondas específicas para la oruga de la raíz de maíz, secuencias de cebadores, secuencias de amplicones y secuencias que codifican secuencias de ARN de cadena doble, y los ortólogos de v-ATPasa y la proteína ribosomal L19 de otros insectos, como se describió previamente (SEQ ID Nº 144 a SEQ ID Nº 159)

La presente invención provee un método para suprimir la expresión genética en un invertebrado plaga, tal como una oruga de la raíz de maíz o una especie relacionada, que comprende el paso de introducir en la dieta de la

plaga una cantidad capaz de suprimir la expresión genética de al menos una molécula de dsARN transcripta a partir de una secuencia de nucleótidos como se detalla en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174 del listado de secuencias, donde al menos un segmento de ésta es complementario con una secuencia de ARNm formada dentro de las células de la plaga, y observar la muerte, la inhibición, el desvanecimiento o la detención de la alimentación de la plaga

En otro aspecto de la presente invención, el método comprende el paso de alimentar a la plaga con una (o más) moléculas de dsARN estabilizadas o su forma modificada, tal como una molécula de siARN, cuya secuencia de nucleótidos es al menos aproximadamente 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o aproximadamente 100% idéntica a una molécula de ARN transcripta a partir de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174

Por consiguiente, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un conjunto de secuencias de nucleótidos aisladas y purificadas, como se indica en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias. Las secuencias de nucleótidos descriptas en la presente documentación, como se detallan en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, fueron aisladas y sustancialmente purificadas a partir de bibliotecas de ADN complementario (ADNc) preparadas a partir de larvas de insectos WCR Las secuencias de nucleótidos descriptas en la presente documentación, como se indica en SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174 en el listado de secuencias, fueron aisladas y sustancialmente purificadas a partir de ADN genómico del insecto plaga oruga de la raíz de maíz del sur, o de reservas de ARNm aisladas del insecto plaga, a partir de secuencias de nucleótidos de ADNc derivadas de estas reservas de ARNm, o sintetizadas de

novo, sobre la base de las secuencias de nucleótidos descriptas en la presente documentación o conocidas en la técnica como secuencias promotoras de la ARN polimerasa T7 de fagos La presente invención provee una molécula de dsARN o siARN estabilizada, o la expresión de uno o más miARN para inhibir la expresión de un gen blanco en un invertebrado plaga, tal como un insecto WCR Una molécula de dsARN, miARN o siARN estabilizada puede comprender al menos dos secuencias codificantes dispuestas en el sentido del marco de lectura o en una orientación antisentido, respecto de al menos un promotor, donde la secuencia de nucleótidos que comprende una cadena en el sentido del marco de lectura y una cadena antisentido está unida o conectada por una secuencia espaciadora de al menos entre aproximadamente cinco y aproximadamente mil nucleótidos, donde la cadena en el sentido del marco de lectura y la cadena antisentido tienen una longitud diferente, y donde cada una de las dos secuencias codificantes comparte al menos 80% de identidad de secuencia, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o aún 100% de identidad de secuencia, con una secuencia de nucleótidos como se indica en una de SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o en una de SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174 en el listado de secuencias

La invención también provee secuencias de nucleótidos que no son de ocurrencia natural (NNO), que pueden usarse para dirigir genes en el invertebrado plaga para obtener la supresión mediada por ARN de cadena doble y efectuar la inhibición deseada de los genes blanco. Puede usarse cualquiera de las secuencias de nucleótidos que se indican en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174 para construir esta secuencia de nucleótidos NNO

La presente invención también provee una construcción de ADN recombinante que codifica las moléculas de dsARN contempladas en la presente documentación, con el fin de introducirla en una célula huésped La

construcción de ADN recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que es transcripta en ARN por la célula huésped. El ARN transcripto forma al menos una molécula de dsARN, de modo tal que una cadena de la molécula de dsARN es codificada por una porción de la secuencia de nucleótidos que es al menos entre aproximadamente 80% y aproximadamente 100% idéntica a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174 La construcción de ADN recombinante es capaz de producir moléculas de dsARN en la célula huésped e inhibir la expresión del gen endógeno, un derivado de éste o una secuencia complementaria con éste en la célula huésped o en una plaga, al ser ingerida la célula huésped transformada por un invertebrado plaga Se coloca una secuencia de nucleótidos de la presente invención bajo el control de una secuencia promotora que puede operar en la célula huésped, y se la expresa para producir secuencias de ácidos ribonucleicos que forman moléculas de dsARN en la célula huésped. Las moléculas de dsARN pueden ser procesadas adicionalmente en la célula huésped o en un invertebrado plaga para formar moléculas de siARN

La presente . invención también provee una secuencia de ADN recombinante para transformar plantas, construida de modo que contiene al menos una secuencia de nucleótidos que no es de ocurrencia natural, que puede transcribirse en una molécula de ARN de cadena simple La molécula de ARN de cadena simple forma una molécula de ARN de cadena doble in vivo mediante hibridización intermolecular, que, cuando se introduce en la dieta de un invertebrado plaga, inhibe la expresión de al menos un gen blanco en una célula del invertebrado plaga La secuencia de nucleótidos que no es de ocurrencia natural está unida operativamente con al menos una secuencia promotora que opera en una célula vegetal transgénica para transcribir la secuencia de nucleótidos que no es de ocurrencia natural unida

operativamente en una o más secuencias de ácidos ribonucleicos Las secuencias de ARN se unen por cuenta propia en moléculas de ARN de cadena doble, y se introducen en la dieta de un invertebrado plaga que se alimenta con la planta transgénica. La introducción de las moléculas de dsARN en la dieta de la plaga permite lograr la inhibición deseada de la expresión de uno o más genes blanco dentro de la plaga.

La presente invención también provee una célula huésped recombinante que tiene en su genoma al menos una secuencia de ADN recombinante que se transcribe en la célula huésped para producir al menos una molécula de dsARN que, una vez ingerida por un invertebrado plaga, opera para inhibir la expresión de un gen blanco en la plaga. La molécula de dsARN es codificada por una porción de una secuencia de nucleótidos que presenta al menos entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100% de identidad con una secuencia de nucleótidos como se indica en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174 en el listado de secuencias Se indican ejemplos de secuencias de nucleótidos para usar en la construcción de agentes de dsARN dirigidos a la supresión de genes de WCR en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174 en el listado de secuencias

La presente invención también provee una construcción de ADN recombinante para transformar plantas, que consiste en al menos dos secuencias que no son de ocurrencia natural que, cuando se expresan in vivo como secuencias de ARN y se introducen en la dieta de un invertebrado plaga, inhiben la expresión de al menos dos genes blanco diferentes en las células del invertebrado plaga La primera secuencia que no es de ocurrencia natural es transcripta en un ARN que forma al menos una primera molécula de dsARN Una porción de la primera molécula de dsARN es codificada por una porción de la primera secuencia que no es de ocurrencia natural, y presenta al menos entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100% de identidad con al

menos una de las secuencias de nucleótidos que se indican en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174 en el listado de secuencias, y con la secuencia de nucleótidos del primer gen blanco, con un derivado de ésta o con una secuencia complementaria con éste La segunda secuencia que no es de ocurrencia natural es transcripta en un ARN que forma al menos una segunda molécula de dsARN. Una porción de la segunda molécula de dsARN es codificada por una porción de la segunda secuencia que no es de ocurrencia natural, y presenta al menos entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100% de identidad con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que se indica en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174 en el listado de secuencias, y con la secuencia de nucleótidos del segundo gen blanco, con un derivado de ésta o con una secuencia complementaria con éste Las dos secuencias que no son de ocurrencia natural se colocan bajo el control operativo de al menos una secuencia promotora. La secuencia promotora funciona expresando la primera y la segunda molécula de dsARN en la célula vegetal transgénica Las moléculas de dsARN se proporcionan en una concentración que permite inhibir la plaga, en la dieta de un invertebrado plaga que se alimenta con la planta transgénica, y la ingestión de las células vegetales por la plaga permite obtener la inhibición deseada de la expresión de los genes blanco en la plaga

La presente invención también provee una célula vegetal transformada que tiene en su genoma al menos una de las secuencias de ADN recombinante para transformar plantas mencionadas previamente. Se generan plantas transgénicas a partir de la célula vegetal transformada, y se producen plantas de la progenie, semillas y productos vegetales, cada uno de los cuales comprende el ADN recombinante, a partir de las plantas transgénicas

Los métodos y las composiciones de la presente invención pueden aplicarse a cualquier planta monocotiledónea y dicotiledónea, dependiendo del

invertebrado plaga que se desea controlar, o pueden aplicarse a través de formulaciones aceptables para el uso farmacéutico a animales vertebrados para proporcionar algún nivel de reducción de las infestaciones de invertebrados plaga Específicamente, las plantas comprenden, sin limitaciones, alfalfa, anet, manzana, albaricoque, alcaucil, arúgula, espárrago, avocado, banana, cebada, poroto, yute, zarzamora, arándano, brócoli, repollo de Bruselas, col, canola, cantalupe, zanahoria, casava, coliflor, apio, cereza, cilantro, pomelo, clementina, café, maní, algodón, pepino, abeto Douglas, berenjena, endivia, escarola, eucalipto, hinojo, higo, calabaza, uva, ananá, rocío de miel, jicama, kiwi, lechuga, puerro, limón, lima, pino Loblolly, mango, melón, hongo, nuez, avena, okra, cebolla, naranja, una planta ornamental, papaya, perejil, arveja, durazno, maní, pera, pimienta, caqui, pino, piña, plátano, ciruela, granada, acero, papa, calabaza, membrillo, pino radiado, radicheta, rábano, frambuesa, arroz, centeno, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, zapallo, frutilla, remolacha, caña de azúcar, girasol, batata, goma dulce, mandarina, té, tabaco, tomate, pasto, una viña, sandía, trigo, ñame y repollito

La presente invención también provee un agente para controlar plagas que comprende una molécula de dsARN transcripta a partir de una secuencia de nucleótidos de la presente invención La secuencia de nucleótidos comparte al menos entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de nucleótidos como se indica en in SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174 en el listado de secuencias En una forma, los agentes para controlar plagas comprenden moléculas de dsARN. En otra forma, los agentes para controlar plagas comprenden moléculas de siARN En aún otra forma, los agentes para controlar plagas comprenden secuencias de ADN recombinantes que codifican moléculas de ARNm que forman las moléculas de dsARN o siARN que se

introducen en las plantas y los microbios En aún otra forma, los agentes para controlar plagas son microbios que contienen secuencias de ADN recombinantes que codifican las moléculas de ARN que forman las moléculas de dsARN o siARN El agente para controlar plagas es preferiblemente un agente para controlar insectos o nematodes plaga

Puede comprenderse que el agente para controlar plagas actúa reduciendo o eliminando la infestación de una oruga de la raíz de maíz, pero también se contempla que los métodos y composiciones detalladas en la presente documentación puedan utilizarse para derivar secuencias relacionadas de otras plagas y utilizar aquellos derivados para controlar las infestaciones de otras plagas. Además, se contempla que puedan seleccionarse los insectos plagas entre cualquier género, familia u orden insectos Para las orugas de la raíz de maíz, se contempla que la plaga se seleccione del mismo género, la misma familia o el mismo orden al que pertenece la oruga de la raíz de maíz. Además, los inventores contemplan que pueda usarse y aplicarse la presente invención para controlar cualquier especie del reino de los insectos y los nematodes, patógenos fúngicos, virus, bacterias y cualquier otro invertebrado que sea plaga de plantas

La invención también provee combinaciones de métodos y composiciones para controlar infestaciones de invertebrados plaga Un medio provee los métodos y las composiciones de dsARN descriptas en la presente documentación para proteger las plantas de infestaciones de insectos, en combinación con uno o más agentes insecticidas que presentan características diferentes de aquellas que presentan los métodos y las composiciones de dsARN Por ejemplo, cuando se introducen proteínas Bt en la dieta de los insectos laga, se obtiene un modo de acción para controlar insectos plaga que es dramáticamente diferente del modo de acción de los métodos y las composiciones de la presente invención Una composición formulada para

administración tópica, o una derivada usando un abordaje transgénico que combina métodos y composiciones de dsARN con métodos y composiciones de Bt, resulta en sinergismos desconocidos previamente en la técnica para controlar infestaciones de insectos. Las plantas transgénicas que producen una o más moléculas de dsARN o siARN, que inhiben determinadas funciones biológicas esenciales en una plaga blanco, junto con una o más proteínas insecticidas B.t., que son tóxicas para la plaga blanco, proporcionan sinergismos sorprendentes Un sinergismo es la reducción en el nivel de expresión requerido para los dsARN o las proteínas Bt. Cuando se combinan, se requiere una dosis efectiva menor de cada agente para controlar plagas Se cree que las proteínas insecticidas Bt crean poros de entrada a través de los cuales pueden penetrar más efectivamente las moléculas de dsARN o siARN, hacia espacios remotos respecto del mesenterón del insecto plaga, o pueden penetrar con mayor eficiencia en las células próximas a las lesiones creadas por las proteínas Bt, por lo que se necesita menos proteína Bt o dsARN para obtener el resultado insecticida deseado o la inhibición o la supresión deseada de una función biológica deseada en la plaga blanco

Los inventores describen en la presente documentación una pluralidad de invenciones, incluyendo un método para controlar infestaciones de invertebrados plaga, que comprenden introducir en la dieta de un invertebrado plaga un agente que comprende o que consiste en un ácido ribonucleico que, al ser ingerido por la plaga, opera inhibiendo la expresión de una secuencia de nucleótidos blanco dentro de las células de la plaga. El ácido ribonucleico proporcionado en la dieta consiste en una secuencia de ribonucleótidos que es la secuencia de nucleótidos, o que es complementaria con ésta La secuencia de ribonucleótidos se transcribe a partir de una secuencia de ADN contigua que tiene al menos entre aproximadamente 19 y aproximadamente 5000 nucleótidos de largo, y que se selecciona del grupo que consiste en

SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y el complemento de éstas El método provee la construcción de una secuencia de nucleótidos que puede usarse para expresar una molécula de ARN que puede ser ingerida por la plaga en una dieta proporcionada a la plaga La dieta puede ser una dieta artificial formulada para satisfacer los requerimientos nutricionales particulares para mantener una plaga con dicha dieta, y puede estar suplida con una cantidad de ARN suficiente para controlar la plaga, que haya sido purificado a partir de un sistema de expresión separado, donde el suplemento de la dieta tendrá el propósito de determinar la cantidad suficiente para controlar la plaga de la composición de AR, o determinar si uno o más ARN particulares, construidos específicamente para unirse o hibridizar en parte con una o más secuencias blanco dentro de la plaga, presentan actividad de supresión genética una vez que la plaga ingiere la dieta proporcionada La dieta también puede ser una célula recombinante transformada con una secuencia de ADN construida para expresar el agente, el ARN o el agente de supresión genética Una vez que la plaga ingiere una o más de estas células transformadas, se observa un resultado genotípico o fenotípico deseado, lo que indica que el agente ha servido para inhibir la expresión de una secuencia de nucleótidos blanco dentro de las células de la plaga.

El invertebrado plaga es preferiblemente un insecto, un arácnido, un nematode, un platelminto, un asquelminto, una plaga fúngica o cualquier otro invertebrado plaga para el cual haya tecnología de supresión genética disponible Más preferiblemente, el invertebrado plaga es uno que es particularmente problemático en términos de infestación de animales o plantas Más particularmente, el invertebrado plaga es un insecto o un nematode, o una plaga fúngica que preferiblemente infesta plantas de cultivos, ornamentales y/o pastos

Una secuencia de ADN que se selecciona para usar en la expresión de un agente de supresión genética de la presente invención tiene preferiblemente al menos entre aproximadamente 19 y aproximadamente 5000 nucleótidos de longitud, y tiene una secuencia al menos en parte sustancialmente idéntica a la cadena en el sentido del marco de lectura o antisentido de una secuencia blanco presente en el ADN de una o más especies plaga blanco particulares La frase "al menos en parte" hace referencia al concepto de que la secuencia de ADN seleccionada para usar en la expresión de un agente de supresión genética puede construirse a partir de una única secuencia derivada de una o más plagas blanco, que puede usarse en la expresión de un ARN que funciona suprimiendo un único gen o una familia de genes en una o más plaga blanco, o denota que la secuencia de ADN puede construirse como una quimera a partir de una pluralidad de secuencias de ADN La pluralidad de secuencias de ADN puede comprender secuencias que derivan cada una de una o más secuencias de nucleótidos de una única plaga, o que pueden derivar de una o más secuencias de nucleótidos de una pluralidad de plagas diferentes En particular, la secuencia seleccionada deberá presentar entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100% de identidad de secuencia de nucleótidos con una secuencia de nucleótidos del ADN de la especie plaga El ADN de la especie plaga puede identificarse aislando directamente el ADN de la especie plaga o identificando secuencias de ARN dentro de la especie plaga y traduciendo en forma inversa las secuencias de ARN en ADN. Se detallan ejemplos de secuencias de ADN de la especie plaga oruga de la raíz de maíz en el listado de secuencias de la presente documentación, como SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174 y los complementos de éstas

Las secuencias de ADN seleccionadas para usar en la expresión de una molécula de ARN de supresión genética pueden incluirse en una composición de polinucleótidos par usar en una célula vegetal En particular, pueden

incorporarse las secuencias de ADN en un vector para usar en la transformación del genoma de una célula vegetal, y puede incorporárselas en un cassette de expresión que contiene al menos un promotor funcional en plantas unido operativamente a la secuencia de ADN seleccionada, junto con cualquier otro elemento de control de la expresión deseado para obtener un nivel de expresión temporal o espacial apropiado en células vegetales La introducción de la composición de polinucleótidos en el genoma de una célula vegetal provee una célula transformada que puede seleccionarse, siempre que se hayan incluido medios de selección apropiados junto con la composición de polinucleótidos, y puede regenerarse en una planta transgénica recombinante La planta transgénica, un evento, puede incluirse en la dieta de la plaga o las plagas para lograr el control de una infestación de plagas. La planta transgénica puede dar lugar a plantas de la progenie, células vegetales y semillas, cada una de las cuales contiene la composición de polinucleótidos

La presente invención provee un método para proteger una planta de las infestaciones de insectos, que comprende proporcionar al insecto plaga una o más células vegetales, cada una de las cuales expresa una molécula de ARN que suprime la expresión genética de una secuencia de ADN que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias ejemplificadas en la presente documentación La ingestión de las células vegetales que contienen el ARN que provoca la supresión genética, es decir, el agente para controlar la plaga o el insecto, resulta en la inhibición de una o más funciones biológicas en la plaga o el insecto

La presente invención provee una composición que contiene dos o más agentes plaguicidas diferentes, cada uno de los cuales es tóxico para la misma especie de plaga o insecto. Como se indica en la presente documentación, uno de estos agentes plaguicidas puede ser una molécula de ARN que opera suprimiendo una función biológica esencial en una o más células de la plaga

Puede incluirse un segundo agente plaguicida en combinación con el primero. El segundo agente puede ser un segundo ARN que provoca supresión genética y es diferente del primero, o el segundo agente puede ser un agente seleccionado del grupo que consiste en una patatina, una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*, una proteína insecticida de *Xenorhabdus*, una proteína insecticida de *Photorhabdus*, una proteína insecticida de *Bacillus laterosporous*, una proteína insecticida de *Bacillus sphearicus* y una lignina Una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* puede ser cualquiera de una cantidad de proteínas insecticidas, incluyendo, sin limitaciones, Cry1, Cry3, TIC851, CryET70, Cry22, una proteína insecticida binaria CryET33 y CryET34, una proteína insecticida binaria CryET80 y CryET76, una proteína insecticida binaria TIC100 y TIC101, una proteína insecticida binaria PS149B1, una proteína insecticida VIP, TIC900 o una proteína relacionada, TIC901, TIC1201, TIC407, TIC417 y quimeras insecticidas de cualquiera de las proteínas insecticidas precedentes.

El gen que se desea suprimir, la función en una célula de la plaga o el aspecto fisiológico o metabólico de la plaga que es favorecido por la expresión del gen que se desea suprimir puede codificar una proteína esencial cuya función predicha se selecciona del grupo que consiste en formación de músculos, formación de hormona juvenil, regulación de hormona juvenil, regulación y transporte de iones, síntesis de enzimas digestivas, mantenimiento del potencial de la membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación de esperma, síntesis de feromonas, percepción de feromonas, formación de las antenas, formación de las alas, formación de las patas, desarrollo y diferenciación, formación de los huevos, maduración de las larvas, formación de enzimas digestivas, síntesis de hemolinfa, mantenimiento de la hemolinfa, neurotransmisión, división celular, metabolismo energético, respiración, y apoptosis Es preferible que la secuencia de ADN seleccionada

para preparar la construcción de supresión derive de las secuencias de nucleótidos detalladas en el listado de secuencias para suprimir genes de orugas de la raíz de maíz Se contempla que el método para controlar infestaciones de invertebrados plaga incluya la introducción en la dieta del invertebrado plaga de un agente, por ejemplo, una primera secuencia de ribonucleótidos expresada a partir de una primera secuencia de ADN que, una vez ingerida por la plaga, funcione inhibiendo una función biológica dentro de dicha plaga, y que dicha primera secuencia de ADN presente aproximadamente 85 y aproximadamente 100% de identidad de secuencia de nucleótidos con una secuencia codificante derivada de dicha plaga La primera secuencia de ribonucleótidos puede hibridizar con una segunda secuencia de ribonucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria con la primera secuencia de ribonucleótidos, y la segunda secuencia de ribonucleótidos se expresa a partir de una segunda secuencia de ADN que corresponde a una secuencia codificante derivada del invertebrado plaga, seleccionada entre las secuencias detalladas en el listado de secuencias de la presente documentación, o los complementos de éstas. Es preferible que la primera y la segunda secuencia de ADN comprendan una secuencia contigua con identidad respecto de una o más de las secuencias detalladas en el listado de secuencias, y que tenga entre aproximadamente 14 y aproximadamente 25 o más nucleótidos contiguos.

La invención funciona en forma óptima cuando se proporciona una dieta que contiene una cantidad capaz de efectuar la supresión genética en la plaga de un agente insecticida, tal como una o más moléculas de ARN producidas a partir de la expresión de una o más secuencias detalladas en el listado de secuencias de la presente documentación, a un invertebrado plaga que tiene un sistema digestivo con un pH que tiene entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 9,5, o entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 9,0, o

entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 8,5, o entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0, o entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,0, o aproximadamente 7,0 Cualquiera de los métodos, los ácidos nucleicos, los ácidos ribonucleicos, las secuencias de ribonucleótidos, las composiciones, las plantas, las células vegetales, las plantas de la progenie, las semillas, los agentes para controlar insectos, los agentes para controlar plagas, los cassettes de expresión descriptos en la presente documentación son opcionalmente funcionales cuando se los introduce en la dieta de una o más plagas que comprenden dicho pH en el tracto digestivo

La dieta de la presente invención puede ser cualquier dieta suficiente para la plaga, incluyendo, sin limitaciones, una dieta o una formulación artificial, una célula vegetal, una pluralidad de células vegetales, un tejido vegetal, una raíz de una planta, una semilla de una planta, y una planta cultivada a partir de una semilla de una planta, donde la dieta comprende una cantidad capaz de inhibir la plaga de una molécula de ARN codificada por una secuencia de ADN que es o es complementaria, o que es sustancialmente o es sustancialmente complementaria con uno o más nucleótidos contiguos, al menos entre aproximadamente 19 y aproximadamente 5000 nucleótidos seleccionados de las secuencias de nucleótidos detalladas en el listado de secuencias, o seleccionadas entre las secuencias de nucleótidos derivadas de una especie de invertebrado plaga particular

Los productos y/o las composiciones de importancia agrícola y comercial, incluyendo, sin limitaciones, alimentos para animales, productos primarios comerciales y productos derivados y subproductos de maíz, que pueden usarse para consumo humano o que pueden usarse en composiciones y productos primarios comerciales dirigidos al consumo humano, incluyendo, sin limitaciones, harina de maíz, alimentos a base de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, pochoclo, tortas de maíz, cereales que

contienen maíz y subproductos de maíz, y semejantes, están dentro del alcance de la presente invención, siempre y cuando estos productos y composiciones particulares contengan cantidades detectables de las secuencias de nucleótidos descriptas en la presente documentación como diagnósticas para cualquier evento transgénico que contenga dichas secuencias de nucleótidos Estos productos son útiles al menos porque es probable que deriven de cultivos y productos que se hayan propagado en campos que contienen menos plaguicidas y organofosfatos, como resultado de la incorporación de los nucleótidos de la presente invención para controlar las infestaciones de invertebrados plaga en plantas. Estos productos primarios comerciales y productos derivados comerciales se producen a partir de semillas obtenidas de una planta transgénica, donde la planta transgénica expresa ARN de uno o más nucleótidos contiguos de la presente invención, o nucleótidos de uno o más invertebrados plaga, y los complementos de éstas. Estos productos primarios comerciales y productos derivados comerciales también pueden ser útiles para controlar invertebrados plaga de estos productos primarios comerciales y productos derivados comerciales, tales como, por ejemplo, el control de los gorgojos de la harina, debido a la presencia en los productos primarios comerciales y los productos derivados comerciales del ARN capaz de suprimir genes de la plaga expresado a partir de una secuencia genética detallada en la presente invención

La invención también provee un medio que puede ser leído en una computadora, que tiene grabada una o más de las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias, o complementos de éstas, para usar en una cantidad de aplicaciones basadas en computadoras, incluyendo, sin limitaciones, la búsqueda de identidad y similitud de ADN, la búsqueda de identidad y similitud de proteínas, las caracterizaciones de perfiles de

transcripción, las comparaciones entre genomas, y los análisis de hibridización artificial.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

A continuación se proporciona una descripción detallada de la invención, cuyo objeto es ayudar a aquellos entrenados en la técnica a poner en práctica la presente invención Aquellos entrenados en la técnica podrán efectuar modificaciones y variaciones en las realizaciones descriptas en la presente documentación, sin apartarse del espíritu o el alcance de la presente invención

Los inventores han descubierto en la presente documentación que, al contrario que las enseñanzas de la técnica previa, la alimentación con una composición que contiene moléculas de ARN de cadena doble, que consiste en secuencias halladas dentro de una o más secuencias de nucleótidos expresadas de una especie de invertebrado, por parte de la especie de invertebrado de la que se obtuvieron las secuencias de nucleótidos, resulta en la inhibición de una o más funciones biológicas dentro de la especie de invertebrado. Particularmente, los inventores han descubierto que la alimentación de moléculas de ARN de cadena doble, que consisten en secuencias de ARN de la oruga de la raíz de maíz, respectivamente a orugas de la raíz de maíz o chinches *Lygus*, sorprendentemente resulta en la muerte o la inhibición del desarrollo de las orugas de la raíz de maíz que ingieren estas composiciones.

Los inventores han identificado la secuencia de nucleótidos de miles de secuencias de ADNc obtenidas de cada una de las especies de invertebrados plaga. Se dedujeron las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADNc indicadas, y se las comparó con todas las secuencias de aminoácidos conocidas Se predice que muchas de las secuencias de ADNc codificarán proteínas que tendrán alguna información de anotación asociada La información de anotación asociada con una secuencia de nucleótidos

particular, y con la secuencia proteica asociada con ella, se basa en la homología o la similitud entre las secuencias de aminoácidos deducidas a través de la traducción de las secuencias de ADNc descriptas en la presente documentación, y las secuencias de aminoácidos conocidas en la técnica y disponibles en bases de datos públicas. Las secuencias de aminoácidos deducidas mencionadas en la presente documentación fueron sometidas a búsquedas BLASTX con secuencias de aminoácidos conocidas, y se asignaron las funcionalidades probables de cada una de las secuencias de aminoácidos deducidas sobre la base de los resultados del alineamiento Se seleccionaron las secuencias de ADN que codificaban proteínas o partes de proteínas conocidas en la técnica como esenciales para la supervivencia, tales como las secuencias de aminoácidos que participan en varias vías bioquímicas metabólicas o catabólicas, la división celular, la reproducción, el metabolismo energético, la digestión, la función neurológica y semejantes, para usarlas en la preparación de moléculas de ARN de cadena doble, que se introdujeron en la dieta de un invertebrado plaga. Como se describe en la presente documentación, la ingestión por una plaga blanco de las composiciones que contienen uno o más dsARN, al menos un segmento de las cuales correspondes a al menos un segmento de ARN sustancialmente idéntico producido en las células de la plaga blanco, resultó en la muerte, el desvanecimiento u otro tipo de inhibición del insecto plaga Estos resultados indican que puede usarse una secuencia de nucleótidos, ya sea de ADN o ARN, derivada de un invertebrado plaga, para construir un huésped o un simbionte recombinante de la plaga que sea blanco de la infestación de la plaga El huésped o el simbionte de la plaga puede transformarse para que contenga una o más de las secuencias de nucleótidos derivadas del invertebrado plaga La secuencia de nucleótidos transformada en el huésped o el simbionte de la plaga codifica uno o más ARN que forman una secuencia de

dsARN en las células o los fluidos biológicos dentro del huésped o el simbionte transformado, lo que hace que el dsARN esté disponible en la dieta de la plaga si/cuando la plaga se alimenta con el huésped o el simbionte transgénico, lo que resulta en la supresión de la expresión de uno o más genes en las células de la plaga, y finalmente en la muerte, el desvanecimiento u otro tipo de inhibición de la plaga

En general, la presente invención se relaciona con el control genético de infestaciones de invertebrados plaga en organismos huésped. Más particularmente, la presente invención incluye los métodos para administrar agentes para controlar plagas a un invertebrado plaga Estos agentes para controlar plagas causan, directa o indirectamente, una alteración en la capacidad de la plaga de mantenerse o crecer, o infestar de otro modo el huésped o el simbionte de la plaga La presente invención provee métodos para emplear moléculas de dsARN estabilizadas en la dieta de la plaga como un medio para suprimir genes deseados en la plaga, lo que permite controlar las infestaciones de plagas en o alrededor del huésped o el simbionte atacado por la plaga Pueden producirse plantas transgénicas usando los métodos de la presente invención, que permiten expresar moléculas de dsARN o siARN recombinantes estabilizadas

Al permitir lograr lo anterior, la presente invención provee un método para inhibir la expresión de un gen blanco en un invertebrado plaga, y en particular, en la oruga de la raíz de maíz occidental (WCR) o en otra especie de insecto coleóptero, lo que resultará en la interrupaión de la alimentación, el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, la infectividad, y eventualmente podrá resultar en la muerte de la plaga El método comprende introducir moléculas de nucleótidos de ARN de cadena doble (dsARN) parcial o completamente estabilizadas, o formas modificadas de éstas, tales como moléculas de ARN pequeñas de interferencia (siARN), en una composición

nutricional utilizada por la plaga como fuente de alimentación, y hacer que la composición nutricional esté disponible para que la plaga se alimente con ella La ingestión de la composición nutricional que contiene moléculas de ARN de cadena doble o de siARN resulta en la asimilación de las moléculas por las células de la plaga, lo que resulta en la inhibición de la expresión de al menos un gen blanco en las células de la plaga La inhibición del gen blanco ejerce un efecto perjudicial sobre la plaga Las moléculas de dsARN o las moléculas de siARN consisten en secuencias de nucleótidos tales como las que se indican en cualquiera de SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, cuya inhibición resulta en la reducción o la remoción de agente basado en una proteína o una secuencia de nucleótidos que es esencial para el crecimiento y el desarrollo de la plaga, o para otras funciones biológicas La secuencia de nucleótidos seleccionada presenta entre aproximadamente 80% y al menos aproximadamente 100% de identidad de secuencia con una de las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias, o el complemento de éstas. Esta inhibición es específica, ya que se selecciona una secuencia de nucleótidos de una porción del gen blanco a partir de la cual se transcribe el dsARN o el siARN inhibidor El método es efectivo para inhibir la expresión de al menos un gen blanco, y puede usarse para inhibir muchos tipos diferentes de genes blanco en la plaga

La presente invención también provee formas diferentes de los agentes para controlar plagas, con el fin de lograr la reducción deseada de las infestaciones de plagas En una forma, los agentes para controlar plagas comprenden moléculas de dsARN En otra forma, los agentes para controlar plagas comprenden moléculas de siARN. En aún otra forma, los agentes para controlar plagas comprenden construcciones de ADN recombinantes que pueden usarse para transformar en forma estable microorganismos o plantas,

que permiten que los microbios o las plantas transformadas codifiquen las moléculas de dsARN o siARN. En otra forma, los agentes para controlar plagas son microbios que contienen las construcciones de ADN recombinantes que codifican las moléculas de dsARN o siARN

Se proporcionan pares de secuencias de nucleótidos aisladas y purificadas a partir de información de bibliotecas de ADNc y/o bibliotecas genómicas. Los pares de secuencias de nucleótidos derivan de cualquier invertebrado plaga preferido, y pueden usarse como cebadores de amplificación térmica para generar las moléculas de dsARN y siARN de la presente invención

La presente invención provee construcciones de ADN recombinantes que pueden usarse para efectuar la transformación estable de un huésped o un simbionte de la plaga deseada en particular Los huéspedes o los simbiontes de la plaga deseados expresan niveles efectivos como plaguicidas de moléculas de dsARN o siARN preferidas de las construcciones de ADN recombinantes, e introducen las moléculas en la dieta de la plaga.

La presente invención también provee, a modo de ejemplo de un organismo huésped o simbionte transformado de la plaga deseada, células vegetales transformadas y plantas transformadas y su progenie Las células vegetales transformadas y las plantas transformadas expresan una o más de las secuencias de dsARN o siARN de la presente invención a partir de una o más de las secuencias de ADN indicadas en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias, o el complemento de éstas

Como se lo usa en la presente documentación, las palabras "supresión genética", tomadas en conjunto, hacen referencia a cualquiera de los métodos bien conocidos para reducir los niveles de proteínas producidas como resultado de la transcripción genética en ARNm, y la traducción subsiguiente del ARNm

La supresión genética también denota la reducción de la expresión de proteínas a partir de un gen o una secuencia codificante, incluyendo la supresión post-transcripcional y la supresión transcripcional de genes La supresión post-transcripcional es mediada por la homología entre la totalidad o parte de un ARNm transcripto a partir de un gen o una secuencia codificante que se desea suprimir, y el ARN de cadena doble correspondiente usado para la supresión, y hace referencia a la reducción sustancial y mensurable de la cantidad de ARNm disponible en la cantidad para que se una a los ribosomas El ARN transcripto puede estar en el sentido del marco de lectura, de modo que el efecto se conoce como co-supresión, en orientación antisentido, de modo que el efecto se conoce como supresión en el sentido del marco de lectura, o en ambas orientaciones, lo que permite producir un dsARN que ejerce un efecto conocido como interferencia de ARN (ARNi) La supresión transcripcional es mediada por la presencia en la célula de un dsARN, un agente de supresión genética que presenta una identidad de secuencia sustancial con una secuencia de ADN promotora o con el complemento de ésta, que presenta un efecto conocido como supresión *trans* del promotor. La supresión genética puede ser efectiva contra un gen vegetal nativo asociado con un carácter, por ejemplo, para proporcionar plantas con niveles reducidos de una proteína codificada por el gen nativo o con niveles potenciados o reducidos de un metabolito afectado La supresión genética también puede ser efectiva contra genes blanco en plagas vegetales que puedan ingerir o entrar en contacto con material vegetal que contenga agentes de supresión genética diseñados específicamente para inhibir o suprimir la expresión de una o más secuencias homólogas o complementarias en las células de la plaga

Se describe la supresión post-transcripcional de genes por ARN antisentido u orientado en el sentido del marco de lectura para regular la expresión genética en células vegetales en las Patentes de los EEUU Nº

5107065, 5759829, 5283184 y 5231020 Se describe el uso de dsARN para suprimir genes en plantas en WO 99/53050, WO 99/49029, la Publicación de Solicitud de Patente de los EEUU Nº 2003/0175965 y 2003/0061626, la Solicitud de Patente de los EEUU Nº 10/465800, y las Patentes de los EEUU Nº 6506559 y 6326193.

Un método preferido para efectuar la supresión post-transcripcional de genes en plantas emplea ARN transcripto orientado en el sentido del marco de lectura y antisentido, que está estabilizado, por ejemplo, como estructuras en hebilla y de tallos y rizos Una construcción de ADN preferida para efectuar la supresión genética post-transcripcional es una donde un primer segmento codifica un ARN que está en orientación antisentido y presenta identidad sustancial con un segmento de un gen que se desea suprimir, que está unido con un segundo segmento que codifica un ARN que es sustancialmente complementario con el primer segmento Se esperaría que esta construcción formara una estructura de tallo y rizo a partir de la hibridización del primer segmento con el segundo segmento, y una estructura de rizo a partir de las secuencias de nucleótidos que unieran ambos segmentos (véanse WO94/01550, WO98/05770 US 2002/0048814 y US 2003/0018993)

Como se lo usa en la presente documentación, el término "ácido nucleico" hace referencia a un polímero de bases de deoxiribonucleótidos o ribonucleótidos de cadena simple o doble, que se lee desde el extremo 5' hacia el extremo 3' El "ácido nucleico" también puede contener opcionalmente bases nucleotídicas que no son de ocurrencia natural o están alteradas, que permiten su lectura correcta por parte de una polimerasa y no reducen la expresión de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico El término "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico" hace referencia a la cadena en el sentido del marco de lectura y antisentido de un ácido nucleico, como cadenas individuales o en un doblete. El término "ácido ribonucleico" (RNA) incluye

ARNi (ARN inhibidor), dsARN (ARN de cadena doble), siARN (ARN pequeño de interferencia), ARNm (ARN mensajero), ARNmi (micro-ARN), ARNt (ARN de transferencia, cargado o descargado con un aminoácido acetilado correspondiente), y ARNc (ARN complementario), y el término "ácido desoxirribonucleico" (ADN) incluye ADNc y ADN genómico, e híbridos de ADN-ARN. Los términos "segmento de ácido nucleico", "segmento de secuencia de nucleótidos" o más generalmente "segmento" serán interpretados por aquellos entrenados en la técnica como un término funcional que incluye secuencias genómicas, secuencias de ARN ribosomal, secuencias de ARN transferencia, secuencias de ARN mensajero, secuencias de operones y secuencias de nucleótidos pequeñas modificadas que expresan o pueden adaptarse para que expresen proteínas, polipéptidos o péptidos

Como se lo usa en la presente documentación, el término "plaga" hace referencia a insectos, arácnidos, crustáceos, hongos, bacterias, virus, nematodes, gusanos planos, gusanos redondos, gusanos ahusados, gusanos en gancho, lombrices solitarias, tripanosomas, esquistosomas, moscas parásitas, pulgas, garrapatas, ácaros y piojos, y semejantes, que invaden el ambiente humano y pueden ingerir o entrar en contacto con una o más células, tejidos o fluidos producidos por un huésped o un simbionte de una plaga transformado para expresar un agente de supresión genética de cadena doble, o recubierto con él, o que pueden ingerir material vegetal que contiene el agente de supresión genética Como se lo usa en la presente documentación, un carácter de "resistencia a plagas" que es característico de una planta transgénica, un animal transgénico, un huésped o un simbionte transgénico, que provoca que la planta, el animal, el huésped o el simbionte sea resistente al ataque de una plaga que típicamente es capaz de inflingir daño o pérdidas a la planta, el animal, el huésped o el simbionte. Esta resistencia a la plaga puede surgir de una mutación natural, o más típicamente de la incorporación

del ADN recombinante que confiere resistencia a la plaga. Para impartir resistencia a insectos a una planta transgénica, un ADN recombinante, por ejemplo, codifica una proteína que mata o inhibe insectos, tal como una delta endotoxina derivada de una bacteria *B. thuringiensis*, por ejemplo, como se usa en las variedades disponibles comercialmente de algodón y maíz, o que puede transcribirse en una molécula de ARN que forma una molécula de dsARN dentro de los tejidos o los fluidos de la planta recombinante. La molécula de dsARN está compuesta en parte por un segmento de ARN, que es idéntico al segmento de ARN correspondiente, codificado por una secuencia de ADN dentro de un insecto plaga que prefiere alimentarse con la planta recombinante La expresión del gen dentro del insecto paga deseado es suprimida por el dsARN, y la supresión de la expresión del gen en el insecto plaga deseado resulta en una planta que presenta resistencia al insecto Fire et al (Patente de los EEUU Nº 6506599) describieron en forma genérica la inhibición de la infestación de plagas, proporcionando detalles específicos solamente para unas pocas secuencias de nucleótidos que fueron efectivas para inhibir la función genética en nematodes de la especie *Caenorhabditis elegans*. De forma similar, Plaetinck et al. (US 2003/0061626) describen el uso de dsARN para inhibir la función genética de una variedad de nematodes plaga Mesa et al (US 2003/0150017) describen el uso de secuencias de dsADN para transformar células huésped, de modo que expresen secuencias de dsARN correspondientes sustancialmente idénticas a las secuencias blanco en patógenos específicos, y particularmente describen la construcción de plantas recombinantes que expresan estas secuencias de dsARN, que pueden ser ingeridas por varias plagas vegetales, lo que facilita la regulación negativa de un gen en el genoma de la plaga y mejora la resistencia de la planta a la infestación de plagas

La presente invención provee la inhibición de la expresión genética de uno o más genes blanco en un insecto plaga, usando métodos de dsARN estabilizados. La invención es particularmente útil en la modulación de la expresión de genes eucariotas, en particular la modulación de la expresión de genes presentes en insectos que presentan un sistema digestivo con un nivel de pH de entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 9,5, más preferiblemente entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0, y aún más preferiblemente entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. Las plagas vegetales con un sistema digestivo con niveles de pH fuera de estos rangos no son candidatos preferidos para los métodos de supresión genética mediados por ARN de cadena doble que usan un método de administración que requiere la ingestión de las moléculas de dsARN preferidas El efecto de modulación puede aplicarse a una variedad de genes expresados en las plagas, incluyendo, por ejemplo, genes endógenos responsables del metabolismo celular o la transformación celular, incluyendo genes de homeostasis, factores de transcripción y otros genes que codifican polipéptidos que participan en el metabolismo celular

Como se lo usa en la presente documentación, el término "expresión" hace referencia a la transcripción y la acumulación estable de ARN en el sentido del marco de lectura o antisentido derivado de los ácidos nucleicos descriptos en la presente invención. La expresión también puede designar la traducción de ARNm en un polipéptido o una proteína Como se lo usa en la presente documentación, el término ARN "en el sentido del marco de lectura" hace referencia a un transcripto de ARN que corresponde a una secuencia o un segmento que, cuando es producido por la plaga blanco, toma la forma de un ARNm que puede traducirse en una proteína en las células de la plaga blanco Como se lo usa en la presente documentación, el término "ARN antisentido" hace referencia a un transcripto de ARN que es complementario con todo o

parte de un ARNm que es producido normalmente en las células de la plaga blanco La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte del transcripto del gen específico, es decir, la secuencia 5' no codificante, la secuencia 3' no traducida, los intrones o la secuencia codificante Como se lo usa en la presente documentación, el término "transcripto de ARN" hace referencia al producto que resulta de la transcripción catalizada por la ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el transcripto de ARN es una copia complementaria de la secuencia de ADN, se conoce como transcripto primario, o puede ser una secuencia de ARN derivada del procesamiento post-transcripcional del transcripto primario, lo que se conoce como ARN maduro

Como se la usa en la presente documentación, la frase "inhibición de la expresión genética" o "inhibición de un gen blanco en las células de un insecto" hace referencia a la ausencia (o la disminución observable) en el nivel de productos proteicos y/o de ARNm del gen blanco La especificidad hace referencia a la capacidad de inhibir el gen blanco sin que se manifiesten efectos sobre otros genes de la célula, y sin efecto alguno sobre cualquier gen dentro de la célula que produce la molécula de dsARN La inhibición de la expresión genética del gen blanco en el insecto plaga puede resultar en nuevos caracteres fenotípicos en el insecto plaga

Sin limitar el alcance de la presente invención, en un aspecto, se proporciona un método para controlar la infestación de un insecto blanco usando las estrategias de dsARN estabilizado El método comprende generar moléculas de dsARN estabilizadas como un tipo de agente para controlar insectos, con el fin de inducir silenciamiento genético en un insecto plaga Los agentes para controlar insectos de la presente invención inducen directa o indirectamente eventos de silenciamiento genético post-transcripcional de genes deseados en el insecto. La regulación negativa de la expresión del gen blanco previene o al menos demora el crecimiento, el desarrollo, la

reproducción y la infectividad del insecto sobre los huéspedes Como se la usa en la presente documentación, a frase "generar moléculas de dsARN estabilizadas" hace referencia a los métodos para emplear tecnología de ADN recombinante disponible en la técnica (por ejemplo, de acuerdo con Sambrook, *et al*, en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición*, *Cold Spring Harbor Press*, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) en la construcción de una secuencia de nucleótidos de ADN que se transcriba en el dsARN estabilizado. Se describen los métodos de construcción detallados de la presente invención más adelante en esta memoria. Como se lo usa en la presente documentación, el término "silenciamiento" hace referencia a la "regulación negativa" de la expresión de la secuencia de nucleótidos deseada, y por consiguiente, a la eliminación de la capacidad de la secuencia de causar un efecto sobre las células del insecto

La presente invención provee en parte un sistema de administración para la administración de agentes para controlar insectos a insectos, que comprende exponer estos últimos a una dieta que contiene los agentes para controlar insectos de la presente invención. De acuerdo con una de las realizaciones, las moléculas de dsARN o siARN estabilizadas pueden incorporarse en la dieta del insecto o pueden colocarse sobre la dieta para que sean consumidas por el insecto

La presente invención también provee en parte un sistema de administración para administrar los agentes para controlar insectos a insectos, que comprende exponerlos a un microorganismo o un huésped, tal como una planta, que contiene los agentes para controlar insectos de la presente invención, a lo que sigue la ingestión del microorganismo o las células huésped, o los contenidos de las células. De acuerdo con otra realización, la presente invención comprende generar una célula vegetal o una planta transgénica que contiene una construcción de ADN recombinante para

transcribir las moléculas de dsARN estabilizadas de la presente invención Como se la usa en la presente documentación, la frase "generar una célula vegetal o una planta transgénica" hace referencia a los métodos para emplear tecnologías de ADN recombinante disponibles en la técnica (por ejemplo, de acuerdo con Sambrook, *et al.*) para construir un vector para transformar plantas que permite transcribir las moléculas de dsARN estabilizadas de la presente invención, para transformar la célula vegetal o la planta, y para generar la célula vegetal o la planta transgénica que contiene las moléculas de dsARN estabilizadas transcriptas En particular, el método de la presente invención puede comprender la construcción recombinante en una célula de una planta, lo que permite obtener transcriptos de dsARN sustancialmente homólogos a una secuencia de ARN codificada por una secuencia de nucleótidos dentro del genoma de un insecto Cuando la secuencia de nucleótidos dentro del genoma de un insecto codifica un gen esencial para la viabilidad y la infectividad del insecto, su regulación negativa resulta en una menor capacidad de supervivencia e infección de las células huésped del insecto Por consiguiente, esta regulación negativa resulta en un "efecto perjudicial" sobre el mantenimiento de la viabilidad y la infectividad del insecto, ya que previene o reduce la capacidad del insecto de alimentarse y sobrevivir con los nutrientes derivados de las células huésped En virtud de esta reducción en la viabilidad y la infectividad del insecto, se facilita la resistencia y/o la tolerancia mejorada a la infección por un insecto en las células de una planta Pueden atacarse los genes del insecto en las etapas madura (adulto), inmadura (larval) o de huevo

En aún otra realización, pueden usarse cepas atenuadas y no patogénicas de microorganismos como vehículo para los agentes para controlar insectos, y en este caso, los microorganismos que transportan estos agentes también se conocen como agentes para controlar insectos Los microorganismos pueden modificarse para que expresen una secuencia de

nucleótidos de un gen blanco, de modo que produzcan moléculas de ARN que comprendan secuencias de ARN homólogas o complementarias con secuencias de ARN halladas típicamente dentro de las células de un insecto La exposición de los insectos a los microorganismos resulta en la ingestión de los microorganismos y la regulación negativa de la expresión de genes blanco mediada directa o indirectamente por las moléculas de ARN, o los fragmentos o derivados de éstas.

Como alternativa, la presente invención provee la exposición de un insecto a los agentes para controlar insectos de la presente invención, incorporados en un mezclador de rocío y aplicados a la superficie de un huésped, tal como un huésped vegetal. En un ejemplo de esta realización, la ingestión de los agentes para controlar insectos por un insecto permite administrar los agentes para controlar insectos en el intestino del insecto, y subsiguientemente a las células dentro del cuerpo del insecto En otra realización, la infección del insecto por los agentes para controlar insectos a través de otros medios, tal como por inyección o por otros métodos físicos, también permite la administración de los agentes para controlar insectos. En aún otra realización, se encapsulan las moléculas de ARN en sí en una matriz sintética, tal como un polímero, y se las aplica a la superficie de un huésped, tal como una planta La ingestión de las células huésped por un insecto permite administrar los agentes para controlar insectos al insecto y resulta en la regulación negativa de un gen blanco en el huésped

Se contempla que las composiciones de la presente invención puedan incorporarse dentro de las semillas de una especie de planta, ya sea como un producto de la expresión de un gen recombinante incorporado en el genoma de las células vegetales, o incorporadas en un recubrimiento o un tratamiento para semillas que se aplique a la semilla antes de sembrarla. La célula vegetal que

contiene un gen recombinante se considera como un evento transgénico en la presente documentación

Se cree que un tratamiento plaguicida para semillas podrá proporcionar ventajas significativas cuando se lo combine con un evento transgénico que proporcione protección contra infestaciones de invertebrados plaga que esté dentro del rango preferido de efectividad contra una plaga blanco Además, se cree que existen situaciones bien conocidas por aquellos entrenados en la técnica donde es ventajoso tener estos eventos transgénicos dentro del rango preferido de efectividad

La presente invención también incluye semillas y plantas con más de un evento transgénico Estas combinaciones se conocen como eventos transgénicos "agrupados" Estos eventos transgénicos agrupados pueden ser eventos que estén dirigidos a la misma plaga blanco, o que puedan ser dirigidos a distintas plagas blanco En un método preferido, una semilla con la capacidad de expresar una proteína Cry 3, o una variante insecticida de ésta, también tiene la capacidad de expresar al menos otro agente insecticida, incluyendo, sin limitaciones, una proteína diferente de una proteína Cry 3, y/o una molécula de ARN cuya secuencia derive de la secuencia de un ARN expresado en la plaga blanco, que forme una estructura de ARN de cadena doble al expresarse en las semillas o las células de una planta cultivada a partir de la semilla, donde la ingestión de una o más células de la planta por la plaga blanco resulte en la supresión de la expresión del ARN en las células de la plaga blanco

En otro método preferido, las semillas que tienen la capacidad de expresar un dsARN cuya secuencia deriva de una plaga blanco también tienen un evento transgénico que provee tolerancia a herbicidas Se prefiere que el evento transgénico que provee tolerancia a herbicidas sea un evento que

provea resistencia a glifosato, N-(fosfonometil)glicina, incluyendo la forma de sal de isopropilamina de dicho herbicida

En el presente método, se trata una semilla que comprende un evento transgénico con un plaguicida

Se cree que la combinación de una semilla transgénica que presenta actividad biológica contra una plaga blanco, como resultado de la producción de una cantidad insecticida de un dsARN insecticida dentro de las células de las semillas o las plantas transgénicas cultivadas a partir de la semilla, con el tratamiento de las semillas con determinados plaguicidas químicos o proteicos proveerá ventaja sinergísticas inesperadas a las semillas sometidas a este tratamiento, incluyendo una eficacia inesperadamente superior en lo referente a la protección contra el daño provocado en la planta transgénica resultante por la plaga blanco. En particular, se cree que el tratamiento de una semilla transgénica capaz de expresar determinadas construcciones que forman moléculas de dsARN, cuya secuencia deriva de una o más secuencias expresadas en una oruga de la raíz de maíz, con entre aproximadamente 100 g y aproximadamente 400 g de determinados plaguicidas por cada 100 kg de semillas, proporcionará una protección inesperadamente superior contra la oruga de la raíz de maíz. Además, se cree que estas combinaciones también serán efectivas para proteger las plantas de maíz emergentes contra el daño provocado por las orugas cortadoras negras También se cree que las semillas de la presente invención tienen la propiedad de reducir el costo del uso de plaguicidas, debido a la menor cantidad de plaguicida necesaria para obtener la cantidad de protección requerida, en comparación con las situaciones en que no se usa la composición y el método de la invención. Más aún, debido a que se usa menos plaguicida y debido a que se lo aplica antes de la siembra y sin una aplicación separada en el campo, se cree que el presente método es

consecuentemente más seguro para el operador y el ambiente, y es potencialmente menos costoso que los métodos convencionales

Cuando se dice que algunos efectos son "sinergísticos", se interpreta que se incluyen los efectos sinergísticos de la combinación de la actividad (o la eficacia) plaguicida de la combinación del evento transgénico y el plaguicida Sin embargo, no se pretende limitar la actividad plaguicida, sino que también deberán incluirse ventajas tales como el mayor alcance de la actividad, el perfil de actividad ventajoso en lo que respecta al tipo y la magnitud de reducción del daño, el menor costo del plaguicida y su aplicación, la menor distribución de plaguicidas en el ambiente, la menor exposición al plaguicida del personal que produce, manipula y siembra semillas de maíz, y otras ventajas conocidas por aquellos entrenados en la técnica

Los plaguicidas son insecticidas que son útiles en las composiciones, en combinación con los métodos y las composiciones de la presente invención, incluyendo los tratamientos y los recubrimientos para semillas, así como los métodos para usar estas composiciones, que pueden hallarse, por ejemplo, en la Patente de los EEUU Nº 6551962, que se incorpora por completo en la presente documentación a modo de referencia

Se ha descubierto que la presente invención es útil para proteger las semillas y las plantas contra un amplio rango de plagas agrícolas, incluyendo insectos, ácaros, hongos, levaduras, mohos, bacterias, nematodes, malezas y plantas parásitas y saprófitas.

Se prefiere que los tratamientos y los recubrimientos para semillas descriptos en la presente documentación puedan usarse en combinación con las semillas transgénicas de la presente invención, en particular mediante la aplicación de un agente plaguicida distinto de las moléculas de dsARN derivadas de las secuencias descriptas en la presente documentación, indicadas en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174,

como se detalla en el listado de secuencias, o los complementos de éstas, a una semilla transgénica Aunque se cree que los tratamientos para semillas pueden aplicarse a una semilla transgénica en cualquier estado fisiológico, se prefiere que la semilla esté en un estado de durabilidad suficiente que no sufra daños durante el proceso de tratamiento Típicamente, la semilla será una semilla que haya sido cosechada en el campo, retirada de la planta transgénica y separada de cualquier otro material vegetal distinto de la semilla. La semilla también será preferiblemente estable desde el punto de vista fisiológico, de modo que el tratamiento no cause daño biológico alguno a la semilla En una realización, por ejemplo, puede aplicarse el tratamiento a semillas de maíz que han sido cosechadas, limpiadas secadas hasta obtener un contenido de humedad menor que aproximadamente 15% en peso En una realización alternativa, la semilla puede ser una semilla que haya sido secada y luego tratada con agua y/u otro material, y luego secada nuevamente antes o durante el tratamiento con el plaguicida. Dentro de las limitaciones descriptas con anterioridad, se cree que puede aplicarse el tratamiento a la semilla en cualquier momento entre la cosecha de la semilla y la siembra de la semilla Como se lo usa en la presente documentación, el término "semilla no sembrada" incluye semillas en cualquier período entre la cosecha de la semilla y la siembra de la semilla en la tierra, con el propósito de hacer germinar y cultivar la planta

Cuando se dice que la semilla no sembrada es "tratada" con el plaguicida, este tratamiento no incluye aquellas prácticas donde se aplica el plaguicida sobre la tierra, en vez de sobre la semilla Por ejemplo, los tratamientos tales como la aplicación del plaguicida en bandas, bandas "T" o en surcos simultáneamente con la siembra de la semilla no se consideran dentro del alcance de la presente invención

El plaguicida, o la combinación de plaguicidas, puede aplicarse "puro", es decir, sin ningún diluyente u otro componente adicional presente. Sin embargo, el plaguicida se aplica típicamente a las semillas bajo la forma de una formulación plaguicida Esta formulación puede contener uno o más componentes adicionales deseables, incluyendo, sin limitaciones, diluyentes líquidos, aglutinantes que sirven como una matriz para el plaguicida, rellenos para proteger las semillas durante condiciones de estés y plastificadores para mejorar la flexibilidad, la adhesión y/o la capacidad de dispersión del recubrimiento Además, para las formulaciones plaguicidas oleosas que contienen poco o ningún relleno, puede ser deseable agregar agentes de secado, tales como carbonato de calcio, kaolina o arcilla, bentonita, perlita, tierras diatomáceas o cualquier otro material adsorbente, a la formulación El uso de estos componentes en los tratamientos para semillas es conocido en la técnica Véase, *por ejemplo*, la Patente de los EEUU Nº 5876739 Aquellos entrenados en la técnica podrán seleccionar fácilmente componentes deseables para usar en la formulación plaguicida, dependiendo del tipo de semilla a tratar y el plaguicida particular seleccionado Además, podrán usarse formulaciones disponibles comercialmente de plaguicidas conocidos, como se demuestra en los ejemplos más adelante.

Los presentes plaguicidas pueden aplicarse sobre una semilla como un componente de un recubrimiento para semillas Los métodos y las composiciones para recubrir semillas que son conocidos en la técnica son útiles cuando se los modifica agregando una de las realizaciones de la combinación de plaguicidas de la presente invención Estos métodos de recubrimiento, y los aparatos para aplicarlos, se describen, por ejemplo, en las Patentes de los EEUU Nº 5918413, 5891246, 5554445, 5389399, 5107787, 5080925, 4759945 y 4465017. Se describen composiciones para recubrir semillas, por ejemplo, en las Patentes de los EEUU Nº 5939356, 5882713,

5876739, 5849320, 5834447, 5791084, 5661103, 5622003, 5580544, 5328942, 5300127, 4735015, 4634587, 4383391, 4372080, 4339456, 4272417 y 4245432, entre otras

Los plaguicidas que son útiles en el recubrimiento son aquellos plaguicidas que se describen en la presente documentación La cantidad de plaguicida usada para tratar la semilla variará dependiendo del tipo de semilla y el tipo de ingredientes activos, pero el tratamiento comprenderá poner en contacto las semillas con una cantidad de la combinación de plaguicidas que sea efectiva como plaguicida Cuando la plaga blanco comprenda insectos, la cantidad será una cantidad de insecticida que sea efectiva como insecticida Como se lo usa en la presente documentación, una cantidad efectiva como insecticida designa la cantidad de insecticida capaz de matar insectos plaga en la etapa de crecimiento de larva o pupa, o capaz de reducir o demorar consistentemente la cantidad de daño producido por los insectos plaga

En general, la cantidad de plaguicida aplicada sobre la semilla en el tratamiento variará entre aproximadamente 10 g y aproximadamente 2000 g de ingrediente activo de plaguicida por cada 100 kg de peso de semillas Preferiblemente, la cantidad de plaguicida estará en el rango de entre aproximadamente 50 g y aproximadamente 1000 g de ingrediente activo por cada 100 kg de semillas, más preferiblemente en el rango de entre aproximadamente 100 g y aproximadamente 600 g de ingrediente activo por cada 100 kg de semillas, y aún más preferiblemente en el rango de entre aproximadamente 200 g y aproximadamente 500 g de ingrediente activo por cada 100 kg de peso de semillas Como alternativa, se ha descubierto que es preferible que la cantidad de plaguicida sea de más de aproximadamente 60 g de ingrediente activo de plaguicida por cada 100 kg de semillas, y más preferiblemente más de aproximadamente 80 g por cada 100 kg de semillas

Los plaguicidas que se usan en el tratamiento no deben inhibir la germinación de la semilla, y deben ser eficaces para proteger las semillas y/o las plantas durante el período en el ciclo de vida del insecto blanco en el que provoca lesiones a las semillas o las plantas En general, el recubrimiento será eficaz por entre aproximadamente 0 y 120 días después de la siembra

Los plaguicidas de la presente invención pueden aplicarse sobre las semillas bajo la forma de un recubrimiento El uso de un recubrimiento es particularmente efectivo para acomodar grandes cargas de plaguicida, lo que típicamente puede ser necesario para tratar plagas refractarias, tales como la oruga de la raíz de maíz, al tiempo que permite prevenir una fitotoxicidad inaceptable debida a la mayor carga de plaguicida

Los recubrimientos formados con una composición plaguicida contemplada en la presente documentación son preferiblemente capaces de alcanzar una baja velocidad de liberación de plaguicida, por difusión o movimiento a través de la matriz hacia el medio circundante

Además de la capa de recubrimiento, puede tratarse la semilla con uno o más de los siguientes ingredientes: otros plaguicidas, incluyendo fungicidas y herbicidas; aseguradores herbicidas; fertilizadores y/o agentes de control biológico Estos ingredientes pueden agregarse como una capa separada, o como alternativa, puede agregárselos en la capa de recubrimiento plaguicida

La formulación plaguicida puede aplicarse sobre las semillas usando técnicas y máquinas de recubrimiento convencionales, tales como técnicas de lecho fluido, el método de molino a rodillo, dispositivos de tratamiento rotostático de semillas y dispositivos de recubrimiento en tambor. Otros métodos, tales como los lechos con líquido a presión, también pueden ser útiles. Las semillas pueden seleccionarse por tamaño antes de recubrirse Después de recubrirse, las semillas típicamente se secan y luego se transfieren

a una máquina de selección por tamaño para realizar la selección Estos procedimientos son conocidos en la técnica

Como se lo usa en la presente documentación, el término "agente para controlar insectos" o "agente de supresión genética" hace referencia a una molécula de ARN particular que consiste en un primer segmento de ARN y un segundo segmento de ARN, unidos por un tercer segmento de ADN El primer y el segundo segmento de ADN están dentro de la molécula de ARN, sustancialmente son repeticiones invertidas uno de otro, y están unidos uno con otro por el tercer segmento de ADN La complementariedad entre el primer y el segundo segmento de ADN resulta en la capacidad de los dos segmentos de hibridizar in vivo e in vitro para formar una molécula de cadena doble, es decir, un tallo, unidos uno con otro en un extremo del primer y el segundo segmento por el tercer segmento, que forma un rizo, de modo que la estructura completa constituye una estructura de tallo y rizo, o pueden formarse estructuras de hibridización aún más estrechas en una estructura de tallo y rizo anudada El primer y el segundo segmento corresponden invariablemente y no respectivamente a una secuencia en el sentido del marco de lectura y una estructura antisentido, respecto del ARNm blanco transcripto a partir del gen blanco en el insecto plaga blanco que es suprimido por la ingestión de la molécula de dsARN El agente para controlar insectos también puede ser una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada (o aislada), y más específicamente puede comprender moléculas de ácidos nucleicos o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos de una biblioteca de ADN genómico (ADNg) o ADNc. Como alternativa, los fragmentos pueden comprender oligonucleótidos más pequeños con entre aproximadamente 15 y aproximadamente 250 residuos de nucleótidos, y más preferiblemente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 residuos de nucleótidos El "agente para controlar insectos" también puede designar una construcción de

ADN que comprende las moléculas de ácidos nucleicos aisladas y purificadas, o los fragmentos de estas moléculas de ácidos nucleicos, de una biblioteca de ADNg o ADNc. Además, el "agente para controlar insectos" puede designar un microorganismo que comprende una construcción de ADN que comprende las moléculas de ácidos nucleicos aisladas y purificadas, o los fragmentos de estas moléculas de ácidos nucleicos, de una biblioteca de ADNg o ADNc. Como se lo usa en la presente documentación, la frase "generar un agente para controlar insectos" hace referencia a los métodos para emplear las tecnologías de ADN recombinante disponibles en la técnica (por ejemplo, de acuerdo con Sambrook, *et al*) para preparar una construcción de ADN recombinante que permita transcribir moléculas de dsARN o siARN estabilizadas, con el fin de construir un vector que permita transcribir las moléculas de dsARN o siARN estabilizadas, y/o transformar y generar las células o los microorganismos que contienen las moléculas de dsARN o siARN estabilizadas transcriptas El método de la presente invención provee la producción de un transcripto de dsARN cuya secuencia de nucleótidos es sustancialmente homóloga a una secuencia de ARN deseada codificada por una secuencia de nucleótidos blanco dentro del genoma de un insecto plaga blanco

Como se lo usa en la presente documentación, el término "genoma", aplicado a las células de un insecto o un huésped, comprende no solamente el ADN cromosómico hallado en el núcleo, sino también el ADN de organelas hallado dentro de los componentes subcelulares de la célula. Por consiguiente, los ADN de la presente invención, introducidos en las células vegetales, pueden integrarse en los cromosomas o localizarse en organelas El término "genoma", aplicado a bacterias, abarca el cromosoma y los plásmidos dentro de una célula huésped bacteriana Por consiguiente, los ADN de la presente invención, introducidos en células huésped bacterianas, pueden integrarse en los cromosomas o localizarse en plásmidos.

La inhibición de la expresión del gen blanco puede cuantificarse midiendo el ARN blanco endógeno o las proteínas producidas mediante la traducción del ARN blanco, y pueden confirmarse las consecuencias de la inhibición examinando las propiedades externas de la célula o el organismo Los procedimientos para cuantificar el ARN y las proteínas son bien conocidos por aquellos entrenados en la técnica Existen múltiples marcadores de selección disponibles que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloramfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina, espectinomicina, rifampicina y tetraciclina, y semejantes

En algunas realizaciones preferidas, se inhibe la expresión genética en al menos 10%, preferiblemente al menos 33%, más preferiblemente al menos 50%, y aún más preferiblemente al menos 80% En realizaciones particularmente preferidas de la invención, se inhibe la expresión genética en al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% o al menos 99%, en las células del insecto, de modo que tiene lugar una inhibición significativa Una inhibición significativa designa una inhibición suficiente que resulta en un fenotipo detectable (por ejemplo, la interrupción del crecimiento larval, la parálisis o la mortalidad, etcétera) o una disminución detectable en el ARN y/o la proteína correspondiente al gen blanco que se desea inhibir. Aunque en algunas realizaciones de la invención tiene lugar la inhibición sustancialmente en todas las células del insecto, en otras realizaciones preferidas tiene lugar la inhibición solamente en un subconjunto de células que expresan el gen. Por ejemplo, si el gen que se desea inhibir tiene una participación esencial en el tracto alimentario del insecto, la inhibición del gen en estas células es suficiente para ejercer un efecto perjudicial sobre el insecto

Las ventajas de la presente invención pueden incluir, sin limitaciones, las siguientes la facilidad de introducir dsARN en las células de los insectos, la baja concentración de dsARN o siARN que puede usarse, la estabilidad del dsARN o el siARN, la efectividad de la inhibición. La capacidad de usar una baja concentración de un dsARN estabilizado permite evitar varias desventajas relacionadas con la interferencia antisentido La presente invención no se limita al uso *in vitro* o a composiciones de secuencias específicas, a un conjunto de genes blanco en particular, a una porción particular de las secuencias de nucleótidos de los genes blanco, o a un transgen particular o a un método de administración particular, al contrario que algunos de los procedimientos disponibles conocidos en la técnica, tales como los métodos antisentido y la co-supresión. Además, la manipulación genética es posible en organismos que no son modelos genéticos clásicos

Al poner en práctica la presente invención, es importante que la presencia de las secuencias de nucleótidos que se transcriben a partir de la construcción recombinante no sea dañina para las células de la planta en la que se expresan de acuerdo con la invención, y que no sean dañinas para los animales en la cadena alimenticia, en particular los seres humanos. Como el producto de la planta puede estar disponible para ser ingerido por seres humanos, la regulación negativa de la expresión de la secuencia de nucleótidos deseada ocurre solamente en el insecto

Por consiguiente, con el fin de lograr la inhibición de un gen blanco en forma selectiva dentro de una especie de insecto que se desea controlar, el gen blanco preferiblemente deberá presentar un bajo grado de identidad de secuencia con genes correspondientes en una planta o un animal vertebrado. Preferiblemente, el grado de identidad de secuencia es menor que aproximadamente 80% Más preferiblemente, el grado de identidad de

secuencia es menor que aproximadamente 70% Más preferiblemente, el grado de identidad de secuencia es menor que aproximadamente 60%.

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona una secuencia de nucleótidos cuya expresión *in vitro* resulta en la transcripción de una secuencia de ARN estabilizada que es sustancialmente homóloga a una molécula de ARN de un gen blanco, en un insecto que comprende una secuencia de ARN codificada por una secuencia de nucleótidos dentro del genoma del insecto. Por consiguiente, una vez que el insecto ingiere la secuencia de ARN estabilizada incorporada en una dieta o rociada sobre la superficie de una planta, se efectúa la regulación negativa de la secuencia de nucleótidos que corresponde al gen blanco en las células de un insecto blanco. La secuencia de nucleótidos regulada en forma negativa en el insecto resulta en un efecto perjudicial sobre el mantenimiento, la viabilidad, la proliferación, la reproducción y la infectividad del insecto. Por consiguiente, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede ser útil para modular o controlar la infestación por un rango de insectos

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se proporciona una secuencia de nucleótidos cuya expresión en una célula microbiana resulta en la transcripción de una secuencia de ARN que es sustancialmente homóloga a una molécula de ARN de un gen blanco, en un insecto que comprende una secuencia de ARN codificada por una secuencia de nucleótidos dentro del genoma del insecto. Por consiguiente, una vez que el insecto ingiere la secuencia de ARN estabilizada contenida en las células del microorganismo, se efectúa la regulación negativa de la secuencia de nucleótidos que corresponde al gen blanco en las células de un insecto blanco. La secuencia de nucleótidos regulada en forma negativa en el insecto resulta en un efecto perjudicial sobre el mantenimiento, la viabilidad, la proliferación, la reproducción y la infectividad del insecto. Por consiguiente, la secuencia de

nucleótidos de la presente invención puede ser útil para modular o controlar la infestación por un rango de insectos.

De acuerdo con aún otra realización de la presente invención, se proporciona una secuencia de nucleótidos cuya expresión en una célula vegetal resulta en la transcripción de una secuencia de ARN que es sustancialmente homóloga a una molécula de ARN de un gen blanco, en un insecto que comprende una secuencia de ARN codificada por una secuencia de nucleótidos dentro del genoma del insecto Por consiguiente, una vez que el insecto ingiere la secuencia de ARN estabilizada contenida las células de la planta, se efectúa la regulación negativa de la secuencia de nucleótidos que corresponde al gen blanco en las células de un insecto blanco La secuencia de nucleótidos regulada en forma negativa en el insecto resulta en un efecto perjudicial sobre el mantenimiento, la viabilidad, la proliferación, la reproducción y la infectividad del insecto Por consiguiente, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede ser útil para modular o controlar la infestación por un rango de insectos

Como se lo usa en la presente documentación, el término "sustancialmente homóloga" o "con homología sustancial", aplicado a una secuencia de ácido nucleico, hace referencia a una secuencia de nucleótidos que hibridiza bajo condiciones estrictas con la secuencia codificante que se indica en cualquiera de SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias, o con los complementos de éstas Las secuencias que hibridizan bajo condiciones estrictas con cualquiera de SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias, o con los complementos de éstas, son aquellas que permiten que ocurra un alineamiento antiparalelo entre las dos secuencias, donde luego, bajo condiciones estrictas, las dos secuencias son capaces de formar enlaces hidrógeno con las bases

correspondientes en la cadena opuesta, con el fin de formar una molécula doble que es suficientemente estable bajo las condiciones estrictas como para poder detectarse usando métodos bien conocidos en la técnica Estas secuencias sustancialmente homólogas tienen entre aproximadamente 65% y aproximadamente 70% de identidad de secuencia, o más preferiblemente entre aproximadamente 80% y aproximadamente 85% de identidad de secuencia, o más preferiblemente entre aproximadamente 90% y aproximadamente 95% de identidad de secuencia, y aproximadamente 99% identidad de secuencia, respecto de las secuencias de nucleótidos de referencia indicadas en cualquiera de SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias, o los complementos de éstas

Como se lo usa en la presente documentación, el término "identidad de secuencia", "similitud de secuencia" u "homología" describe relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos El porcentaje de "identidad de secuencia" entre dos secuencias se determina comparando dos secuencias alineadas en forma óptima en una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, faltas de coincidencia) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones), con el fin de efectuar el alineamiento óptimo de las dos secuencias El porcentaje se calcula determinando la cantidad de posiciones donde hay residuos de bases de nucleótidos o aminoácidos en ambas secuencias para obtener la cantidad de posiciones coincidentes, dividiendo la cantidad de posiciones coincidentes por la cantidad de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia Se dice que una secuencia que es idéntica en cualquier posición, en comparación con una secuencia de referencia, es idéntica a la secuencia de referencia, y viceversa. Se dice que una primera secuencia de nucleótidos, cuando se

observa en la dirección 5' a 3', es un "complemento" o es complementaria con una segunda secuencia de nucleótidos o una secuencia de referencia, observada en la dirección 3' a 5', si la primera secuencia de nucleótidos presenta una complementariedad completa con la segunda secuencia de nucleótidos o la secuencia de referencia. Como se lo usa en la presente documentación, se dice que la secuencia de las moléculas de ácidos nucleicos presenta una "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las secuencias, leída en dirección 5' a 3', es complementario con cada nucleótido de la otra secuencia, leído en dirección 3' a 5' Una secuencia de nucleótidos que es complementaria con una secuencia de nucleótidos de referencia tendrá una secuencia idéntica a la secuencia del complemento inverso de la secuencia de nucleótidos de referencia Estos términos y descripciones están bien definidos en la técnica y son fácilmente comprendidos por aquellos entrenados en la técnica

Como se lo usa en la presente documentación, una "ventana de comparación" hace referencia a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, usualmente entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100, más usualmente entre aproximadamente 100 y aproximadamente 150, donde se compara una secuencia con una secuencia de referencia con la misma cantidad de posiciones contiguas, una vez alineadas en forma óptima ambas secuencias. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, faltas de coincidencia) de aproximadamente 20% o menos, en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones), con el fin de efectuar el alineamiento óptimo de las dos secuencias Aquellos entrenados en la técnica podrán consultar los métodos detallados usados para alinear secuencias en el paquete de software Wisconsin Genetics, versión 7 0 (Genetics Computer

Group, 575 Science Drive Madison, Wis , EEUU), o podrán consultar Ausubel et al (1998) para hallar una descripción detallada de análisis de secuencia

El gen blanco de la presente invención deriva de una célula de insecto, o como alternativa, de un gen extraño, tal como una secuencia genética extraña de un virus, un hongo, un insecto o un nematode, entre otros El término "deriva" denota que la secuencia es la totalidad o una porción de la secuencia de nucleótidos de ocurrencia natural del gen blanco del genoma de una célula de insecto, particularmente la totalidad o una porción de la secuencia de nucleótidos de ocurrencia natural del ARNm recubierto, cortado y poliadenilado, expresado a partir de la secuencia de ADN de ocurrencia natural, tal como puede hallarse en la célula si el gen es un gen estructural, o la secuencia de la totalidad o una porción de un ARN que es distinto de un gen estructural, incluyendo, sin limitaciones, ARNt, un ARN catalítico, un ARN ribosomal, un micro-ARN, y semejantes Una secuencia deriva de una de estas secuencias de ARN de ocurrencia natural si la secuencia derivada es producida sobre la base de la secuencia de nucleótidos del ARN nativo, presenta entre aproximadamente 80% y aproximadamente 100% de identidad de secuencia con la secuencia nativa, e hibridiza con la secuencia nativa bajo condiciones de hibridización estrictas En una realización, el gen blanco comprende una secuencia de nucleótidos como se indica en cualquiera de SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias, o los complementos de éstas. Dependiendo del gen blanco particular y la dosis de moléculas de dsARN administradas, este proceso puede resultar en una pérdida parcial o completa de la función del gen blanco, o cualquier nivel de supresión intermedio deseado

La presente invención también provee una secuencia de ADN artificial que puede expresarse en una célula o un microorganismo, y que es capaz de inhibir la expresión del gen blanco en una célula, un tejido o un órgano de un

insecto, donde la secuencia de ADN artificial comprende al menos una molécula de dsADN que codifica una o más secuencias de nucleótidos diferentes, donde cada una de las secuencias de nucleótidos diferentes comprende una secuencia de nucleótidos en el sentido del marco de lectura y una secuencia de nucleótidos antisentido, conectadas por una secuencia espaciadora que codifica una molécula de dsARN de la presente invención La secuencia espaciadora constituye parte de la secuencia de nucleótidos en el sentido del marco de lectura o la secuencia de nucleótidos antisentido, y formará la molécula de dsARN entre las secuencias en el sentido del marco de lectura y antisentido La secuencia de nucleótidos en el sentido del marco de lectura o la secuencia de nucleótidos antisentido es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos del gen blanco, o un derivado de ésta, o una secuencia complementaria a ésta La molécula de dsADN está colocada bajo el control operativo de una secuencia promotora que funciona en la célula, el tejido o los órganos del huésped, que expresan el dsADN para producir moléculas de dsARN En una realización, la secuencia de ADN artificial puede derivar de una secuencia de nucleótidos como se indica en in SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias

La invención también provee una secuencia de ADN artificial que puede expresarse en las células de una planta, y que, al expresarse el ADN en ARN y al ser ingerida la planta por una plaga blanco, se logra la supresión del gen blanco en una célula, un tejido o un órgano del insecto plaga El dsARN comprende al menos una o múltiples secuencias de genes estructurales, donde cada una de las secuencias de genes estructurales comprende una secuencia de nucleótidos en el sentido del marco de lectura y una secuencia de nucleótidos antisentido, conectadas por una secuencia espaciadora que forma un rizo dentro de las secuencias complementaria y antisentido. La secuencia

de nucleótidos en el sentido del marco de lectura o la secuencia de nucleótidos antisentido es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos del gen blanco, a un derivado de ésta o a una secuencia complementaria con ésta Las una o más secuencias de genes estructurales están colocadas bajo el control operativo de una o más secuencias promotoras, al menos una de las cuales puede operar en la célula, el tejido o el órgano de un organismo procariota o eucariota, particularmente un insecto En una realización, la secuencia de ADN artificial comprende aproximadamente de SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, o de SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias, los complementos de éstas

Como se lo usa en la presente documentación, el término "gen que no es de ocurrencia natural", "secuencias codificantes que no son de ocurrencia natural", "secuencia artificial", o "secuencias codificantes sintéticas" para transcribir el dsARN o el siARN de la presente invención, o fragmentos de éstas, hacen referencia a cualquier tipo de aislamiento o manipulación genética que resulta en la obtención de una secuencia codificante que transcribe un dsARN o un siARN de la presente invención, o fragmentos de éste Esto incluye el aislamiento de la secuencia codificante a partir de su estado de ocurrencia natural, la manipulación de la secuencia codificante mediante (1) inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos, (2) inserción, deleción o sustitución de segmentos, (3) síntesis química, tal como química de fosforamidita y semejantes, mutagénesis específica por sitios, corte de la secuencia codificante o cualquier otro método de manipulación o aislamiento

La secuencia del gen que no es de ocurrencia natural o el fragmento de ésta de acuerdo con este aspecto de la invención para controlar WCR puede clonarse entre dos promotores con especificidad tisular, tales como dos promotores específicos para raíz que pueden operar en una célula vegetal transgénica, y que pueden expresarse en ella para producir ARNm en la célula

vegetal transgénica, de modo que se formen moléculas de dsARN en ella. Las moléculas de dsARN contenidas en los tejidos vegetales son ingeridas por un insecto para efectuar la supresión deseada de la expresión del gen blanco

La presente invención también provee un método para obtener un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos para producir un dsARN o un siARN de la presente invención. En una realización preferida, el método de la presente invención para obtener el ácido nucleico comprende (a) analizar una biblioteca de ADNc o ADNg con una sonda de hibridización que comprende la totalidad o una porción de una secuencia de nucleótidos de un insecto blanco, o un homólogo de ésta, (b) identificar un clon de ADN que hibridiza con la sonda de hibridización, (c) aislar el clon de ADNc identificado en el paso (b), y (d) secuenciar el fragmento de ADNc o ADNg que comprende el clon aislado en el paso (c), donde la molécula de ácido nucleico transcribe la totalidad o una porción sustancial de la secuencia de nucleótidos de ARN, o un homólogo de ésta.

En otra realización preferida, el método de la presente invención para obtener un fragmento de ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos para producir una porción sustancial de un dsARN o un siARN de la presente invención, comprende: (a) sintetizar un primer y un segundo oligonucleótido cebador, que corresponden a una porción de una de las secuencias de nucleótidos de un insecto blanco, y (b) amplificar el inserto de ADNc o ADNg presente en un vector de clonación, usando el primer y el segundo oligonucleótido cebador del paso (a), donde la molécula de ácido nucleico amplificada transcribe una porción sustancial de un dsARN o un siARN de la presente invención.

Al poner en práctica la presente invención, un gen blanco puede derivar de una oruga de la raíz de maíz (CRW), tal como WCR o SCR, o cualquier especie de insecto que provoque daños en plantas de cultivo, y como

consecuencia, pérdidas de rendimiento. Los presentes inventores contemplan el uso de varios criterios para seleccionar genes blanco preferidos El gen es uno cuyo producto proteico tiene una velocidad de recambio elevada, de modo que la inhibición por dsARN resulta en una disminución rápida en los niveles de proteína. En determinadas realizaciones, es ventajoso seleccionar un gen para el cual una pequeña caída en el nivel de expresión resulta en efectos perjudiciales para el insecto Es preferible atacar un amplio rango de especies de insectos, por lo que el gen seleccionado deberá estar muy conservado entre estas especies. Del mismo modo, con el fin de conferir especificidad, en determinadas realizaciones de la invención se seleccionará un gen que contenga regiones pobremente conservadas entre especies de insectos individuales, o entre insectos y otros organismos. En determinadas realizaciones, puede ser deseable seleccionar un gen que no tenga homólogos conocidos en otros organismos

Como se lo usa en la presente documentación, el término "forma derivada" hace referencia a una secuencia de nucleótidos específica que puede obtenerse de una fuente o una especie definida en particular, aunque no tiene que ser necesariamente de la misma fuente o especie

En una realización, se selecciona un gen que se expresa en el mesenterón del insecto. El ataque de genes expresados en el mesenterón evita la necesidad de dispersar el dsARN dentro del insecto. Los genes blancos para usar en la presente invención pueden incluir, por ejemplo, aquellos que comparten homologías sustanciales con secuencias de nucleótidos de genes conocidos que se expresan en el mesenterón, que codifican componentes proteicos de la V-ATPasa protónica de la membrana plasmática (Dow et al , 1997, J. Exp. Biol , 200.237-245, Dow, Bioenerg Biomemb , 1999, 31:75-83). Este complejo proteico es la única fuente de energía del transporte de iones epiteliales, y es responsable de la alcalinización del lumen del mesenterón La

V-ATPasa también se expresa en los túbulos de Malpighi, una prolongación del intestino posterior que participa en el balance de fluidos y la destoxificación de compuestos extraños, de una forma análoga al riñón de los mamíferos

En otra realización, se selecciona un gen que esencialmente participa en el crecimiento, el desarrollo y la reproducción de un insecto. Los ejemplos de genes incluyen, sin limitaciones, un gen CHD3 y un gen de β-tubulina El gen CHD3 en *Drosophila melanogaster* codifica una proteína con actividad de ADN helicasa dependiente de ATP, que participa en el ensamblaje/desmantelamiento de la cromatina en el núcleo. Se han hallado secuencias similares en diversos organismos, tales como *Arabidopsis thaliana, Caenorhabditis elegans* y *Saccharomyces cerevisiae* Los genes de la familia de la beta-tubulina codifican proteínas asociadas con microtúbulos que son componentes del citoesqueleto celular Pueden hallarse secuencias relacionadas en organismos tan diversos como *Caenorhabditis elegans* y *Manduca Sexta*

Otros genes blanco para usar en la presente invención pueden incluir, por ejemplo, aquellos que tienen funciones importantes en la viabilidad, el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y la infectividad Estos genes blanco pueden ser genes de homeostasis, factores de transcripción y genes específicos para insectos, o mutaciones letales en *Drosophila* Los genes blanco para usar en la presente invención también pueden ser aquellos de otros organismos, por ejemplo, de un nematode (por ejemplo, *C elegans*) Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos para usar en la presente invención también pueden derivar de genes vegetales, virales, bacterianos o de hongos, cuyas funciones hayan sido establecidas en la literatura y cuyas secuencias de nucleótidos compartan una similitud sustancial con los genes banco en el genoma de un insecto De acuerdo con un aspecto de la presente invención para controlar la WCR, las secuencias blanco pueden derivar

esencialmente del insecto WCR blanco En el Listado de Secuencias pueden hallarse algunos ejemplos de secuencias blanco de bibliotecas de ADNc de WCR que codifican proteínas de *D. v. Virgifera*, o fragmentos de éstas, que son homólogas a proteínas conocidas

Se conocen moléculas de ácidos nucleicos de *D virgifera* que codifican homólogos de proteínas conocidas (Andersen et al., Solicitud de Patente de los EEUU con Nº de Caso 10/205189)

Aunque las secuencias descriptas por Andersen et al están dirigidas primariamente a la WCR, en la práctica de la invención es preferible usar segmentos de ADN cuyas secuencias presentan al menos aproximadamente 80% de identidad, o al menos 90% de identidad, o al menos 95% de identidad, o al menos 98% de identidad, o al menos aproximadamente 100% de identidad con secuencias que corresponden a los genes o las secuencias codificantes de la plaga que se desea controlar. Las secuencias con menos de 80% de identidad con un gen blanco son menos efectivas La inhibición es específica para uno o más genes de la plaga, cuya secuencia corresponde al dsARN La expresión de genes no relacionados no se ve afectada Esto permite específicamente el ataque selectivo de especies de plagas, sin que haya efectos sobre otros organismos expuestos a las composiciones de la presente invención.

Un segmento de ADN para usar en la presente invención tiene al menos entre aproximadamente 19 y aproximadamente 23, o entre aproximadamente 23 y aproximadamente 100 nucleótidos, pero tiene menos de aproximadamente 2000 nucleótidos de longitud

La invención no se limita a los genes específicos descriptos en la presente documentación, sino que comprende cualquier gen cuya inhibición produzca un efecto perjudicial sobre un insecto plaga

Para muchos de los insectos que son blancos potenciales para el control de acuerdo con la presente invención, puede haber información limitada respecto de las secuencias de la mayor parte de los genes o el fenotipo resultante de la mutación de genes particulares Entonces, los presentes inventores contemplan que la selección de genes apropiados a partir de insectos plaga para usar en la presente invención pueda efectuarse usando información disponible del estudio de genes correspondientes en un organismo modelo, tal como *Drosophila*, en otra especie de insecto, o aún en una especie de nematode, en una especie de hongo, o en una especie de planta, donde se hayan caracterizado los genes. En algunos casos, será posible obtener la secuencia de un gen correspondiente de un insecto blanco realizando búsquedas en bases de datos, tales como GenBank, usando el nombre del gen o la secuencia, por ejemplo, de *Drosophila*, otro insecto, un nematode, un hongo o una planta a partir de la que se haya clonado el gen blanco Una vez obtenida la secuencia, puede usarse una PCR para amplificar un segmento seleccionado apropiadamente del gen en el insecto para usarlo en la presente invención

Con el fin de obtener un segmento de ADN del gen correspondiente en una especie de insecto, se diseñan cebadores de PCR sobre la base de la secuencia hallada en la WCR o en otros insectos de los que se ha clonado el gen Se diseñan cebadores para amplificar un segmento de ADN de longitud suficiente para usar en la presente invención Se prepara ADN (ADN genómico o ADNc) a partir de la especie de insecto y se usan los cebadores de PCR para amplificar el segmento de ADN Las condiciones de amplificación se seleccionan para que la amplificación tenga lugar aún si los cebadores no coinciden exactamente con la secuencia blanco Como alternativa, puede clonarse el gen (o una porción de éste) a partir de una biblioteca de ADNg o ADNc preparada a partir de la especie de insecto plaga, usando el gen de

WCR u otro gen de insecto conocido como sonda. Se conocen técnicas para realizar la PCR y la clonación a partir de bibliotecas En los ejemplos se proporcionan detalles adicionales sobre el proceso por el cual pueden aislarse segmentos de ADN a partir de especies de insectos plaga, sobre la base de la secuencia de genes clonados previamente a partir de WCR u otra especie de insecto blanco Aquellos entrenados en la técnica reconocerán que puede usarse una variedad de procedimientos para aislar segmentos de genes de especies de insectos plaga que corresponden a genes aislados previamente de otras especies

Los insectos que pueden provocar daños en plantas generalmente pertenecen a tres categorías, basadas en sus métodos de alimentación, y estas categorías son, respectivamente, insectos masticadores, succionadores y perforadores, que pertenecen a los órdenes Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Heteroptera, Ctenophalides, Arachnidiae e Hymenoptera. Los insectos masticadores que se alimentan con tejido vegetal, tal como raíces, hojas, retoños y espigas provocan daños importantes. Los ejemplos de esta gran categoría de insectos incluyen los escarabajos y sus larvas. La WCR y la SCR pertenecen a los insectos masticadores. Sus larvas se alimentan con las raíces de una planta, en particular, una planta de maíz, y los adultos se alimentan principalmente con el follaje Los genes derivados de la WCR o la SCR, o de cualquier especie de los órdenes mencionados previamente, pueden considerarse blancos para poner en práctica la presente invención

Se ha descubierto que el presente método es útil para proteger semillas y plantas contra un amplio conjunto de plagas agrícolas, incluyendo insectos, ácaros, hongos, levaduras, mohos, bacterias, nematodes, malezas y plantas parásitas y saprófitas, y semejantes

Cuando un insecto es la plaga blanco de la presente invención, estas plagas incluyen, sin limitaciones,:

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*, *Keiferia 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* e *Yponomeuta* spp.,

del orden Coleoptera, por ejemplo,

Agriotes spp , *Anthonomus* spp , *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites* spp , *Curculio* spp , *Dermestes* spp , *Diabrotica* spp , *Epilachna* spp , *Eremnus* spp , *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptrus* spp , *Melolontha* spp., *Orycaephilus* spp , *Otiorhynchus* 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., *Leptocorisa* spp , *Nezara* spp., *Piesma* spp , *Rhodnius* spp , *Sahlbergella singularis*, *Scotinophara* spp , *Triatoma* spp , *Miridae* family spp such as *Lygus hesperus y Lygus lineolaris*, *Lygaeidae* family spp. such as *Blissus leucopterus* y *Pentatomidae* family 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 langerum*, *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 , *Pulvinaria aetiopica*, *Quadraspidiotus* spp , *Rhopalosiphum* spp , *Saissetia* spp., *Scaphoideus* spp , *Schizaphis* spp., *Sitobion* spp , *Trialeurodes vaporariorum, Trioza erytreae* y *Unaspis citri*,

del orden Hymenoptera, por ejemplo,

Acromyrmex, *Atta* spp., *Cephus* spp , *Diprion* spp , *Dipnonidae*, *Gilpinia polítoma*, *Hoplocampa* spp , *Lasius* sppp , *Monomonum pharaonis*, *Neodipnon* spp, *Solenopsis* spp y *Vespa* ssp.,

del orden Diptera, por ejemplo,

Aedes spp , *Anthengona 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., *Liriomysa* spp , *Lucilia* spp , *Melanagromyza* spp , *Musca* ssp , *Oestrus* spp , *Orseolia* spp , *Oscinella frit*, *Pegomyia hyosciami*, *Phorbia* spp , *Rhagoletis pomonella*, *Sciara* spp , *Stomoxis* spp , *Tabanus* spp , *Tannia* spp y *Tipula* spp ,

del orden Siphonaptera, por ejemplo,

Ceratophyllus spp. und *Xenopsylla cheopis* and

del orden *Thysanura*, por ejemplo,

Lepisma saccharina

Se ha descubierto que la presente invención es particularmente efectiva cuando el insecto plaga es *Diabrotica spp.*, y especialmente cuando la plaga es *Diabrotica virgifera virgifera* (oruga de la raíz de maíz occidental, WCR), *Diabrotica barben* (oruga de la raíz de maíz del norte, NCR), *Diabrotica virgifera zeae* (oruga de la raíz de maíz mejicana, MCR), *Diabrotica balteata* (oruga de la raíz de maíz brasilera (BZR) o complejo de orugas de la raíz de maíz brasileras (BCR), que consiste en *Diabrotica viridula y Diabrotica speciosa*), o *Diabrotica undecimpunctata howardii* (oruga de la raíz de maíz del sur, SCR)

La presente invención también es particularmente efectiva para controlar especies de insectos que perforan y/o succionan los fluidos de las células y los tejidos de las plantas, incluyendo, sin limitaciones, chinches de olor (especies de la familia Pentatomidae), y chinches de plantas de la familia Miridae, tales

como las chinches de plantas opacas occidentales (de la especie *Lygus hesperus*), chinches de plantas opacas (de la especie *Lygus lineolaris*), y chinches de las legumbres pálidas (*Lygus elisus*).

Sorprendentemente, las modificaciones de los métodos descriptos en la presente documentación también son particularmente útiles para controlar las plagas de cultivos del orden Lepidoptera

La presente invención provee moléculas de dsARN o siARN estabilizadas para controlar infestaciones de insectos. Las secuencias de nucleótidos de dsARN o siARN comprenden cadenas dobles de ribonucleótidos polimerizados, y pueden incluir modificaciones en el esqueleto de azúcares fosfato o los nucleósidos Pueden diseñarse modificaciones en la estructura del ARN para permitir una inhibición genética específica.

En una realización, las moléculas de dsARN pueden modificarse empleando un proceso enzimático, con el fin de generar moléculas de siARN El siARN puede mediar efectivamente en el efecto de regulación negativa de algunos genes blanco en algunos insectos Este proceso enzimático puede efectuarse utilizando una enzima ARNasa III o una enzima DICER, presente en las células de un insecto, un animal vertebrado, un hongo o una planta en la vía del ARNi eucariota (Elbashir et al , 2002, Methods, 26(2):199-213, Hamilton y Baulcombe, 1999, Science 286·950–952) Este proceso también puede utilizar una DICER o una ARNasa III recombinante, introducida en las células de un insecto blanco empleando procedimientos de ADN recombinante bien conocidos por aquellos entrenados en la técnica. La enzima DICER y la enzima ARNasa III pueden ser de ocurrencia natural en un insecto o pueden prepararse empleando procedimientos de ADN recombinante, pero en cualquier caso cortan cadenas grandes de dsARN en oligonucleótidos de menor tamaño Las enzimas DICER cortan específicamente las moléculas de dsARN en trozos de siARN, cada uno de los cuales tiene aproximadamente 19-

25 nucleótidos de longitud, mientras que las enzimas ARNasa III normalmente cortan las moléculas de dsARN en siARN de 12-15 pares de bases Las moléculas de siARN producidas por cualquiera de las enzimas tienen 2 ó 3 nucleótido salientes en el extremo 3', y extremos 5' fosfato y 3' hidroxilo Las moléculas de siARN generadas por la enzima ARNasa III son iguales que aquellas producidas por las enzimas DICER en la vía del ARNi eucariota, y por consiguiente, son atacadas y degradadas por un mecanismo de degradación de ARN inherente de la célula, una vez que se despliegan, se separan en ARN de cadena simple e hibridizan con las secuencias transcriptas por el gen blanco. Este proceso resulta en la degradación o la remoción efectiva de la secuencia de ARN codificada por la secuencia de nucleótidos del gen blanco en el insecto. El resultado es el silenciamiento de una secuencia de nucleótidos blanco particular dentro del insecto. Pueden hallarse descripciones detalladas del proceso enzimáticas en Hannon (2002, Nature, 418:244-251)

La inhibición de un gen blanco usando la tecnología de dsARN estabilizado de la presente invención presenta especificidad de secuencia, ya que las secuencias de nucleótidos que corresponden a la región doble del ARN son el blanco de la inhibición genética Se prefiere la inhibición del ARN que contiene una secuencia de nucleótidos idéntica a una porción del gen blanco También se ha descubierto que las secuencias de ARN con inserciones, deleciones y mutaciones de puntos individuales respecto de la secuencia blanco son efectivas para la inhibición. Al poner en práctica la presente invención, es preferible que el dsARN de inhibición y la porción del gen blanco compartan al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, o aproximadamente 90% de identidad de secuencia, o aproximadamente 95% de identidad de secuencia, o aproximadamente 99% de identidad de secuencia, o aún aproximadamente 100% de identidad de secuencia Como alternativa, la región doble del ARN puede definirse en términos funcionales como una

secuencia de nucleótidos capaz de hibridizar con una porción del transcripto del gen blanco Una secuencia incompleta que presenta una mayor homología compensa la menor longitud con mayor homología La longitud de las secuencias de nucleótidos idénticas puede ser de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o al menos aproximadamente 1000 bases Normalmente deberá usarse una secuencia de más de 20-100 nucleótidos, aunque se preferirá una secuencia de más de aproximadamente 200-300 nucleótidos, y especialmente se preferirá una secuencia de más de aproximadamente 500-1000 nucleótidos, dependiendo del tamaño del gen blanco. La invención tiene la ventaja de poder tolerar variaciones de secuencia que puedan esperarse debido a la mutación genética, el polimorfismo de las cepas o las divergencias evolutivas La molécula de ácido nucleico introducida puede no necesitar ser absolutamente homóloga, puede no necesitar tener una longitud completa, respecto del producto de transcripción primario o el ARNm procesado completo del gen blanco Por consiguiente, aquellos entrenados en la técnica comprenderán que, como se describe en la presente documentación, no se necesita un 100% de identidad de secuencia entre el ARN y el gen blanco para poner en práctica la presente invención

Las moléculas de dsARN pueden sintetizarse *in vivo* o *in vitro* El dsARN puede formarse a partir de una cadena de ARN auto-complementaria o a partir de dos cadenas de ARN complementarias La ARN polimerasa endógena de la célula puede mediar en la transcripción *in vivo*, puede usarse una ARN polimerasa clonada para efectuar la transcripción *in vivo* o *in vitro* La inhibición puede ser dirigida por la transcripción específica en un órgano, un tejido o un tipo celular, la estimulación de una condición ambiental (por ejemplo, infección, estrés, temperatura, inductores químicos), y/o la modificación de la transcripción en una etapa del desarrollo o una edad determinada Las cadenas de ARN pueden estar o no poliadeniladas, las cadenas de ARN pueden o no

ser capaces de traducirse en un polipéptido en el aparato de traducción de la célula

Aquellos entrenados en la técnica pueden producir el ARN, el dsARN, el siARN o el miARN de la presente invención por medios químicos o enzimáticos, empleando reacciones manuales o automatizadas, o *in vivo* en otro organismo También puede producirse ARN mediante síntesis orgánica parcial o total, puede introducirse cualquier ribonucleótido modificado empleando síntesis enzimática u orgánica *in vitro* El ARN puede ser sintetizado por una ARN polimerasa celular o una ARN polimerasa de bacteriófago (por ejemplo, T3, T7, SP6). El uso y la producción de una construcción de expresión son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, WO 97/32016, las Patente de los EEUU Nº 5593874, 5698425, 5712135, 5789214 y 5804693) Si se lo sintetiza por medios químicos o empleando una síntesis enzimática *in vitro*, puede purificarse el ARN antes de introducirlo en la cantidad Por ejemplo, puede purificarse el ARN a partir de una mezcla efectuando una extracción con un solvente o una resina, precipitación, electroforesis, cromatografía, o una combinación de éstas Como alternativa, puede usarse el ARN con una purificación mínima o nula, con el fin de evitar las pérdidas provocadas por el procesamiento de la muestra. Puede secarse el ARN para almacenarlo, o puede disolvérselo en una solución acuosa La solución puede contener amortiguadores o sales para promover el alineamiento y/o la estabilización de las cadenas dobles

Para transcribir un transgen o una construcción de expresión *in vivo*, puede usarse una región reguladora (por ejemplo, un promotor, un potenciador, un silenciador y una señal de poliadenilación) para transcribir la cadena (o las cadenas) de ARN Entonces, en una realización, las secuencias de nucleótidos que se usan para producir moléculas de ARN pueden estar unidas operativamente a una o más secuencias promotoras funcionales en un

microorganismo, un hongo o una célula huésped vegetal En circunstancias ideales, las secuencias de nucleótidos se colocan bajo el control de un promotor endógeno que reside normalmente en el genoma del huésped La secuencia de nucleótidos de la presente invención, bajo el control de una secuencia promotora unida operativamente, puede estar adicionalmente rodeada por secuencias adicionales que afecten ventajosamente la transcripción y/o la estabilidad del transcripto resultante Estas secuencias se localizan generalmente río arriba del promotor unido operativamente y/o río abajo del extremo 3' de la construcción de expresión, y pueden aparecer río arriba del promotor y río abajo del extremo 3' de la construcción de expresión, aunque también se contempla el uso de una de estas secuencias río arriba sola

En otra realización, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede contener una repetición invertida separada por una "secuencia espaciadora" La secuencia espaciadora puede ser una región que comprenda cualquier secuencia de nucleótidos que facilite la formación de estructuras secundarias entre cada repetición, donde sea necesario En una realización de la presente invención, la secuencia espaciadora es parte de la secuencia codificante de ARNm en el sentido del marco de lectura o antisentido Como alternativa, la secuencia espaciadora puede comprender cualquier combinación de nucleótidos u homólogos de ésta que sean capaces de unirse en forma covalente con una molécula de ácido nucleico. La secuencia espaciadora puede comprender una secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 10-100 nucleótidos de longitud, o como alternativa al menos aproximadamente 100-200 nucleótidos de longitud, al menos aproximadamente 200-400 nucleótidos de longitud, o al menos aproximadamente 400-500 nucleótidos de longitud

Para los propósitos de la presente invención, las moléculas de dsARN o siARN pueden obtenerse a partir de la CRW por medio de una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias de un gen blanco de CRW, derivadas de una biblioteca de ADNg o ADNc de oruga de la raíz de maíz, o porciones de éstas. Las larvas de WCR pueden prepararse usando métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica, y puede extraerse ADNARN de ellas. Pueden usarse larvas con diversos tamaños, que varían entre larvas de primer estadío y CRW completamente desarrolladas para los propósitos de extracción de ADN/ARN de la presente invención Pueden usarse bibliotecas de ADN genómico o ADNc generadas a partir de WCR para efectuar la amplificación por PCR y producir el dsARN o el siARN

Luego pueden amplificarse los genes blancos por PCR, y puede secuenciárselos usando métodos disponibles en la técnica Aquellos entrenados en la técnica podrán modificar las condiciones de PCR para asegurar una formación óptima de productos de PCR Puede usarse el producto de PCR confirmado como molde para efectuar una transcripción *in vitro* y generar ARN en el sentido del marco de lectura y antisentido, con los promotores mínimos incluidos

Los presentes inventores contemplan que puedan usarse las secuencias de ácidos nucleicos identificadas y aisladas en la presente invención a partir de cualquier especie de insecto en el reino de los insectos para controlar la WCR y otros insectos blanco En un aspecto de la presente invención, el ácido nucleico puede derivar de una especie del orden Coleoptera Específicamente, el ácido nucleico puede derivar de escarabajos de las hojas pertenecientes al género *Diabrotica* (Coleoptera, Chrysomelidae) y, más específicamente, las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención pueden derivar de una especie del grupo *virgifera* Más específicamente, las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención pueden derivar de *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte,

que se conoce comúnmente como WCR. Los ácidos nucleicos aislados pueden ser útiles, por ejemplo, para identificar un gen blanco y construir un vector recombinante que permita producir los dsARN o los siARN estabilizados de la presente invención, para proteger las plantas de las infestaciones de insectos WCR

Entonces, en una realización, la presente invención comprende secuencias de nucleótidos aisladas y purificadas de WCR o *Lygus* que podrán usarse como agentes para controlar insectos. Las secuencias de nucleótidos aisladas y purificadas comprenden aquellas que se indican en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias

Los ácidos nucleicos de WCR u otros insectos que pueden usarse en la presente invención también pueden comprender moléculas de ácidos nucleicos aisladas y sustancialmente purificadas de Unigenes y EST, o fragmentos de estas moléculas de ácidos nucleicos Las moléculas de ácidos nucleicos EST pueden codificar porciones significativas o la mayor parte de los polipéptidos Como alternativa, los fragmentos pueden comprender oligonucleótidos más pequeños, con entre aproximadamente 15 y aproximadamente 250 residuos de nucleótidos, y más preferiblemente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 residuos de nucleótidos Como alternativa, las moléculas de ácidos nucleicos para usar en la presente invención pueden tomar la forma de bibliotecas de ADNc de WCR, *Lygus* o cualquier otra especie de invertebrado plaga

Como se la usa en la presente documentación, la frase "un ácido nucleico sustancialmente purificado", "una secuencia artificial", "un ácido nucleico aislado y sustancialmente purificado", o "una secuencia de nucleótidos aislada y sustancialmente purificada" hace referencia a un ácido nucleico que ya no está acompañado por algunos de los materiales con los que está

asociado en su estado natural, o a un ácido nucleico cuya estructura no es idéntica a aquella de cualquier ácido nucleico de ocurrencia natural Los ejemplos de ácidos nucleicos sustancialmente purificados incluyen (1) ADN con la secuencia de parte de moléculas de ADN genómico de ocurrencia natural, pero que no están rodeadas por dos secuencias codificantes que rodean la parte de la molécula en el genoma del organismo donde aparecen naturalmente, (2) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procariota o un eucariota, de modo tal que la molécula resultante no es idéntica a cualquier vector o ADN genómico de ocurrencia natural o, (3) una molécula separada, tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o un fragmento de restricción, (4) ADN recombinantes, y (5) ADN sintéticos Un ácido nucleico sustancialmente purificado también puede estar compuesto por uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético

Las moléculas de ácidos nucleicos de WCR, *Lygus* o de otras especies de invertebrados plaga, y los fragmentos de éstas, pueden emplearse para obtener otras moléculas de ácidos nucleicos de otras especies, con el fin de usarlas en la presente invención para producir las moléculas de dsARN y siARN deseadas. Estas moléculas de ácidos nucleicos incluyen las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la secuencia codificante completa de una proteína, y secuencias circundantes de estas moléculas Además, estas moléculas de ácidos nucleicos incluyen moléculas de ácidos nucleicos que codifican miembros de la misma familia de genes. Estas moléculas pueden obtenerse fácilmente usando las moléculas de ácidos nucleicos descriptas previamente, o fragmentos de éstas, para analizar bibliotecas de ADNc o ADNg obtenidas de *D v virgifera* o *Lygus hesperus* Los métodos para formar estas bibliotecas son bien conocidos en la técnica

Las moléculas de ácidos nucleicos de WCR o *Lygus*, y los fragmentos de éstas, también pueden emplearse para obtener otras moléculas de ácidos nucleicos, tales como homólogos de ácidos nucleicos, que pueden usarse en la presente invención para producir las moléculas de dsARN y siARN deseadas Estos homólogos incluyen las moléculas de ácidos nucleicos que codifican, por completo o en parte, proteínas homólogas de otras especies, plantas u otros organismos Estas moléculas pueden obtenerse fácilmente usando las moléculas de ácidos nucleicos descriptas previamente, o fragmentos de éstas, para analizar EST, bibliotecas de ADNc o ADNg Los métodos para formar estas bibliotecas son bien conocidos en la técnica. Estas moléculas homólogas pueden diferir en sus secuencias de nucleótidos de aquellas halladas en una o más de SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias, o los complementos de éstas descriptos en la presente documentación, ya que no se necesita una complementariedad completa para obtener una hibridización estable Estas moléculas de ácidos nucleicos también incluyen moléculas que, aunque son capaces de hibridizar específicamente con las moléculas de ácidos nucleicos, pueden carecer de complementariedad En una realización particular, pueden usarse métodos de 3' o 5' RACE para obtener estas secuencias (Frohman, M A *et al*, *Proc. Natl Acad Sci (U S A.) 85* 8998-9002 (1988), Ohara, O *et al*, *Proc Natl Acad Sci. (U.S A) 86*:5673-5677 (1989)). En general, puede usarse cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos descriptas previamente, o fragmentos de éstas, para generar dsARN o siARN apropiados para usar en una dieta, en una mezcladora de rocío o en una construcción de ADN recombinante de la presente invención

Como se la usa en la presente documentación, la frase "secuencia codificante", "secuencia de nucleótidos estructural" o "molécula de ácido nucleico estructural" hace referencia a una secuencia de nucleótidos que se

traduce en un polipéptido, usualmente vía ARNm, cuando se la coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas Los límites de la secuencia codificante son determinados por un codón de inicio de la traducción en el extremo 5' y un codón de detención en el extremo 3' Una secuencia codificante puede incluir, sin limitaciones, ADN genómico, ADNc, EST y secuencias de nucleótidos recombinantes

El término "ADN recombinante" o "secuencia de nucleótidos recombinante" hace referencia a un ADN que contiene una modificación genética, efectuada mediante una manipulación por mutagénesis, enzimas de restricción y semejantes

Las moléculas de ácidos nucleicos, o los fragmentos de las moléculas de ácidos nucleicos, u otras moléculas de ácidos nucleicos de WCR, son capaces de hibridizar específicamente con otras moléculas de ácidos nucleicos bajo determinadas circunstancias. Como se lo usa en la presente documentación, se dice que dos moléculas de ácidos nucleicos son capaces de hibridizar específicamente una con otra si las dos moléculas son capaces de formar una estructura antiparalela de ácido nucleico de cadena doble Se dice que una molécula de ácido nucleico es el complemento de otra molécula de ácido nucleico si presentan una complementariedad completa Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si pueden hibridizar una con otra con suficiente estabilidad como para permitirles permanecer alineadas una con otra bajo al menos condiciones convencionales "de baja severidad". De forma similar, se dice que las moléculas son complementarias si pueden hibridizar una con otra con suficiente estabilidad como para permitirles permanecer alineadas una con otra bajo al menos condiciones convencionales "de alta severidad" Se describen las condiciones de severidad convencionales en Sambrook, *et al.*, y Haymes, *et al* en *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985).

Por lo tanto, se permiten alejamientos de la complementariedad completa, siempre y cuando dichos alejamientos no anulen completamente la capacidad de las moléculas de formar una estructura de cadena doble. Por consiguiente, con el fin de que una molécula de ácido nucleico o un fragmento de la molécula de ácido nucleico sirva como sonda o cebador, se necesita que solamente presente una secuencia suficientemente complementaria como para que pueda formar una estructura de doble cadena bajo las concentraciones particulares de solvente y sal empleadas.

Las condiciones de severidad apropiadas que promueven la hibridización de ADN, por ejemplo, cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6,0X a aproximadamente 45°C, seguido por un lavado de SSC 2,0X a 50°C, son conocidas por aquellos entrenados en la técnica y pueden hallarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1989), 6.3 1-6.3 6 Por ejemplo, la concentración de sal en el paso de lavado puede seleccionarse entre una severidad baja de aproximadamente SSC 2,0X a 50°C y una severidad alta de aproximadamente SSC 2,0X a 50°C. Además, puede incrementarse la temperatura en el paso de lavado desde condiciones de baja severidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, hasta condiciones de alta severidad a aproximadamente 65°C. Puede variarse la temperatura y la sal, o puede mantenerse constante la temperatura o la concentración de sal mientras se altera la otra variable

Los ácidos nucleicos para usar en la presente invención pueden hibridizar específicamente con una o más moléculas de ácidos nucleicos de WCR, o con complementos de éstas, bajo condiciones de severidad moderada, por ejemplo, con SSC aproximadamente 2,0x y a aproximadamente 65°C Un ácido nucleico que pueda usarse en la presente invención incluirá aquellas moléculas de ácidos nucleicos que hibridicen específicamente con una o más moléculas de ácidos nucleicos descriptas en la presente documentación,

indicadas en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias, o con complementos de éstas, bajo condiciones de severidad elevada Preferiblemente, un ácido nucleico que pueda usarse en la presente invención presentará al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 98% o aún aproximadamente 100% de identidad de secuencia con una o más moléculas de ácidos nucleicos indicadas en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias, o como se describe en la presente documentación, o un ácido nucleico que pueda usarse en la presente invención presentará aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 98% o aún aproximadamente 100% de identidad de secuencia con una o más moléculas de ácidos nucleicos indicadas en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias asiladas de ADN genómico de un insecto plaga.

Puede usarse la totalidad o una porción sustancial de los ácidos nucleicos de WCR para aislar ADNc, ADNg y ácidos nucleicos que codifican proteínas homólogas de *Diabrotica*, o fragmentos de éstas, de la misma especie o de especies diferentes En los ejemplos se presentan descripciones detalladas de los procedimientos para aislar e identificar los ácidos nucleicos de la presente invención a partir de bibliotecas de ADNc o ADNg

Los ácidos nucleicos de la presente invención también podrán sintetizarse, por completo o en parte, especialmente cuando sea deseable proporcionar secuencias preferidas por la planta, empleando métodos conocidos en la técnica Por consiguiente, puede sintetizarse la totalidad o una porción de los ácidos nucleicos de la presente invención usando codones preferidos por un huésped seleccionado Los codones preferidos por el

huésped pueden determinarse, por ejemplo, a partir de los codones usados con más frecuencia en las proteínas expresadas en una especie huésped particular Otras modificaciones de las secuencias de nucleótidos podrán resultar en mutantes con una actividad ligeramente alterada

La presente invención provee en parte un sistema de administración para administrar los agentes para controlar insectos a insectos. Las moléculas de dsARN o siARN estabilizadas de la presente invención pueden introducirse directamente en las células de un insecto, o puede introducírselas en una cavidad extracelular, un espacio intersticial, el sistema linfático, el sistema digestivo, en la circulación del insecto por ingestión oral o a través de otro medio que puedan emplear aquellos entrenados en la técnica Los métodos de introducción oral pueden incluir la mezcla directa del ARN con alimento para el insecto, así como abordajes de modificación, donde se modificará una especie que se use como alimento para que exprese el dsARN o el siARN, luego se alimentará el insecto que se desee afectar con ella En una realización, por ejemplo, pueden incorporarse las moléculas de dsARN o siARN en la dieta del insecto, o puede colocárselas sobre ella. En otra realización, puede rociarse el ARN sobre la superficie de la planta. En aún otra realización, puede expresarse el dsARN o el siARN en microorganismos, y pueden aplicarse los microorganismos sobre la superficie de una planta, o puede introducírselos en la raíz o el tallo a través de un medio físico, tal como una inyección En aún otra realización, puede modificarse genéticamente una planta para que exprese el dsARN o el siARN en una cantidad suficiente para matar los insectos de los que se sepa que infectan la planta.

Específicamente, al poner en práctica la presente invención en WCR, puede introducirse el dsARN o el siARN en el interior del insecto, en el mesenterón, para lograr la inhibición deseada de los genes blanco Las moléculas de dsARN o siARN pueden incorporarse en la dieta o pueden

colocarse sobre la dieta, como se describió previamente, para que luego sean ingeridas por los insectos En cualquier caso, se proporcionarán los dsARN de la presente invención en la dieta de la plaga blanco La plaga blanco de la presente invención presentará un pH en el tracto digestivo de entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 9,5, o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 8,5, o entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8, o entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,7, o de aproximadamente 7,0 El tracto digestivo de la plaga blanco se define en la presente documentación como la localización dentro de la plaga donde se expone el alimento ingerido por la plaga blanco a un ambiente que es favorable para la asimilación de las moléculas de dsARN de la presente invención, sin que se vean sometidas a un pH tan extremo que provoque la disociación de los enlaces hidrógeno entre las cadenas dobles del dsARN y se formen moléculas de cadena simple

Además, con el propósito de controlar infestaciones de insectos en plantas, la administración de dsARN para controlar insectos sobre las superficies de una planta mediante una aplicación de rocío proporciona otro medio para proteger las plantas. En este caso, puede hacerse fermentar una bacteria modificada para que produzca y acumule dsARN, y pueden formularse los productos de la fermentación como un producto rociable compatible con las prácticas agrícolas comunes Las formulaciones pueden incluir adhesivos y humectantes apropiados, necesarios para obtener una cobertura foliar eficiente, así como protectores UV para proteger los dsARN del daño provocado por la radiación UV Estos aditivos se usan comúnmente en la industria de los bioinsecticidas y son bien conocidos por aquellos entrenados en la técnica Del mismo modo, las formulaciones para aplicar sobre la tierra pueden incluir formulaciones granulares que sirvan como carnada para las larvas de insectos plaga terrestres, tales como la oruga de la raíz de maíz

También se anticipa que los dsARN producidos por síntesis química o enzimática puedan formularse de una forma consistente con las prácticas agrícolas comunes, y que sea posible usarlos como productos rociables para controlar infestaciones de insectos Las formulaciones pueden incluir adhesivos y humectantes apropiados necesarios para obtener una cobertura foliar eficiente, así como protectores UV para proteger los dsARN del daño provocado por la radiación UV Estos aditivos se usan comúnmente en la industria de los bioinsecticidas y son bien conocidos por aquellos entrenados en la técnica Estas aplicaciones podrán combinarse con otras aplicaciones de insecticidas rociables, basados en elementos biológicos o no, para mejorar la protección de la planta contra el daño provocado por la alimentación de los insectos

Los presentes inventores contemplan el uso de las cepas bacterianas que producen proteínas insecticidas para producir dsARN con el propósito de controlar insectos Estas cepas pueden presentar propiedades mejoradas de control de insectos Puede usarse una variedad de huéspedes bacterianos diferentes para producir dsARN para controlar insectos. Los ejemplos de bacterias pueden incluir *E. coli*, *B thuringiensis*, *Pseudomonas* sp , *Photorhabdus* sp , *Xenorhabdus* sp , *Serratia entomophila* y especies relacionadas con *Serratia* sp , *B sphaencus*, *B cereus*, *B laterosporus*, *B. popilliae*, *Clostridium bifermentans* y especies de *Clostridium*, u otras bacterias formadores de esporas gram positivas

La presente invención también se relaciona con construcciones de ADN recombinantes que pueden expresarse en un microorganismo Pueden introducirse los ácidos nucleicos exógenos, a partir de los cuales se transcribe el ARN de interés, en una célula huésped microbiana, tal como una célula bacteriana o una célula fúngica, usando métodos conocidos en la técnica

Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden introducirse en una amplia variedad de microorganismos huésped procariotas y eucariotas, con el fin de producir las moléculas de dsARN o siARN estabilizadas. El término "microorganismo" incluye especies de microbios procariotas y eucariotas, tales como bacterias y hongos. Los hongos incluyen levaduras y hongos filamentosos, entre otros Los ejemplos de procariotas, tanto Gram negativos como Gram positivos, incluyen *Enterobacteriaceae*, tales como *Escherichia, Erwinia, Shigella, Salmonella* y *Proteus, Bacillaceae, Rhizobiceae,* tales como *Rhizobium, Spirillaceae,* tales como photobacterium, *Zymomonas, Serratia, Aeromonas, Vibrio, Desulfovibrio, Spirillum, Lactobacillaceae; Pseudomonadaceae*, tales como *Pseudomonas* y *Acetobacter, Azotobacteraceae, Actinomycetales* y *Nitrobacteraceae* Entre los eucariotas pueden mencionarse los hongos, tales como *Phycomycetes* y *Ascomycetes,* incluyendo levaduras, tales como *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*, y levaduras *Basidiomycetes*, tales como *Rhodotorula, Aureobasidium, Sporobolomyces* y semejantes

Con el propósito de proteger las plantas contra insectos, una gran cantidad de microorganismos que son habitantes conocidos del fitoplano (la superficie de las hojas de las plantas) y/o la rizosfera (la tierra que rodea las raíces de las plantas) de una amplia variedad de cultivos importantes también pueden constituir células huésped deseables para manipular, propagar, almacenar, administrar y/o mutagenizar las construcciones recombinantes descriptas Estos microorganismos incluyen bacterias, algas y hongos Son de particular interés los microorganismos, tales como las bacterias, *por ejemplo,* de los géneros *Bacillus* (incluyendo las especies y subespecies *B thuringiensis kurstaki* HD-1, *B thuringiensis kurstaki* HD-73, *B thuringiensis sotto, B thuringiensis berliner, B thuringiensis thuringiensis, B thuringiensis tolworthi, B thuringiensis dendrolimus, B. thuringiensis alesti, B thuringiensis galleriae,*

B thuringiensis aizawai, *B. thuringiensis subtoxicus*, *B thuringiensis entomocidus*, *B thuringiensis tenebrionis* y *B. thuringiensis san diego*), *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Zanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Metilophilius*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* y *Alcaligenes*, los hongos, particularmente las levaduras, por ejemplo, de los géneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* y *Aureobasidium* Son de particular interés las especies de bacterias de la fitosfera, tales como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioti*, *Alcaligenes eutrophus* y *Azotobacter vinlandii*, y las especies de levaduras de la fitosfera, tales como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S pretoriensis*, *S cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S odorus*, *Kluyveromyces veronae* y *Aureobasidium pollulans*

Un vector de ADN recombinante bacteriano puede ser un plásmido linear o circular cerrado. El sistema de vectores puede ser un único vector o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se desea introducir en el genoma del huésped bacteriano Además, el vector bacteriano puede ser un vector de expresión. Por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos indicadas en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias, o fragmentos de éstas, pueden insertarse apropiadamente en un vector bajo el control de un promotor apropiado, que funcione en uno o más huéspedes microbianos para dirigir la expresión de una secuencia codificante u otra secuencia de ADN unida Existen muchos vectores disponibles para este propósito, y la selección del vector apropiado dependerá principalmente del

tamaño del ácido nucleico a insertar en el vector y la célula huésped particular a transformar con el vector. Cada vector contiene varios componentes, dependiendo de su función (amplificación de ADN o expresión de ADN) y la célula huésped particular con la que es compatible Los componentes del vector para la transformación bacteriana generalmente incluyen, sin limitaciones, uno o más de los siguientes una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores de selección, y un promotor inducible que permite la expresión del ADN exógeno

Los vectores de expresión y clonación generalmente contienen un gen de selección, también conocido como marcador de selección Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o el crecimiento de las células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) proporcionan nutrientes críticos que no están disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa de *Bacilli* Aquellas células que son transformadas exitosamente con una proteína heteróloga o un fragmento de ésta producen una proteína que confiere resistencia a drogas, por lo que las células sobreviven el régimen de selección

Un vector de expresión para producir un ARNm también podrá contener un promotor inducible que sea reconocido por el organismo bacteriano huésped y esté unido al ácido nucleico que codifica, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico que codifica el ARNm de *D. v virgifera* o el fragmento de ésta de interés Los promotores inducibles apropiados para usar con huéspedes bacterianos incluyen el promotor de β-lactamasa, los promotores P_L y P_R del fago λ de *E. coli*, y el promotor de galactosa de *E coli*, el promotor de arabinosa, el promotor de fosfatasa alcalina, el promotor de triptofano (trp), y el

promotor del operón lactosa, y variaciones de éstos, y promotores híbridos tales como el promotor *tac* Sin embargo, hay otros promotores bacterianos inducibles apropiados

El término "unido operativamente", como se lo usa en referencia a una secuencia reguladora y una secuencia de nucleótidos estructural, denota que la secuencia reguladora provoca la expresión regulada de la secuencia de nucleótidos estructural unida. Las "secuencias reguladoras" o los "elementos de control" designan las secuencias de nucleótidos localizadas río arriba (secuencias 5' no codificantes), dentro o río abajo (secuencias 3' no traducidas) de una secuencia de nucleótidos estructural, y que incluye en el momento y el nivel o la magnitud de la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN, o la traducción de la secuencia de nucleótidos estructural asociada Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias directrices de la traducción, intrones, potenciadores, estructuras de tallo-rizo, secuencias de unión de represores y secuencias de reconocimiento de poliadenilación, y semejantes

Como alternativa, pueden integrarse las construcciones de expresión con un vector de integración en el genoma bacteriano Los vectores de integración típicamente contienen al menos una secuencia homóloga al cromosoma bacteriano que permite que el vector se integre Las integraciones son el resultado de las recombinaciones entre el ADN homólogo en el vector y el cromosoma bacteriano Por ejemplo, los vectores de integración construidos con ADN de varias cepas de *Bacillus* se integran en el cromosoma de *Bacillus* (EP 0 127328) Los vectores de integración también pueden estar compuestos por secuencias de bacteriófagos o transposones También se conocen vectores suicidas en la técnica

La construcción de vectores apropiados que contienen uno o más de los componentes indicados previamente emplea procedimientos convencionales

de ADN recombinante Los plásmidos o los fragmentos de ADN aislados se separan, se recortan y se reúnen bajo una forma deseada para generar los plásmidos necesarios Los ejemplos de vectores de expresión bacterianos disponibles incluyen, sin limitaciones, vectores de clonación y expresión multifuncionales de *E. coli*, tales como Bluescript™ (Stratagene, La Jolla, CA), con los cuales, por ejemplo, puede unirse una proteína de *D. v virgifera*, o un fragmento de ésta, en marco con las secuencias aminoterminales y los 7 residuos subsiguientes de β-galactosidasa, con el fin de producir una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke y Schuster, 1989, *J. Biol Chem 264*:5503-5509), y semejantes

Una construcción recombinante para levaduras puede incluir típicamente una de las siguientes· una secuencia promotora, una secuencia asociada de fusión, una secuencia directriz, una secuencia de terminación de la transcripción, un marcador de selección Estos elementos pueden combinarse en un cassette de expresión que puede mantenerse en un replicón, tal como un elemento extracromosomal (por ejemplo, plásmidos) capaz de mantenerse en forma estable en un huésped, tal como una levadura o una bacteria El replicón puede tener dos sistemas de replicación, lo que permitirá que se mantengan, por ejemplo, para expresarse en una levadura y para clonarse y amplificarse en un huésped procariota Los ejemplos de estos vectores de transporte levadura-bacteria incluyen YEp24 (Botstein et al , 1979, Gene, 8 17-24), pCl/1 (Brake et al , 1984, Proc Natl Acad Sci USA, 81 4642-4646), e YRp17 (Stinchcomb et al , 1982, J Mol Biol , 158 157) Además, un replicón puede ser un plásmido con una cantidad de copias alta o baja Un plásmido con una gran cantidad de copias generalmente tendrá una cantidad de copias que variará entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200, y típicamente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150 Un huésped que contenga un

plásmido con una gran cantidad de copias preferiblemente tendrá al menos aproximadamente 10, y más preferiblemente al menos aproximadamente 20

Las secuencias promotoras de levadura útiles pueden derivar de genes que codifican enzimas en la vía metabólica Los ejemplos de estos genes incluyen alcohol deshidrogenasa (ADH) (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) (EP 0 3215447) El gen PHO5 de levadura, que codifica fosfatasa ácida, también provee secuencias promotoras útiles (Myanohara et al , Proc. Natl Acad Sci USA, 80 1, 1983) Además, los promotores sintéticos que no aparecen en la naturaleza también pueden funcionar como promotores de levadura Los ejemplos de estos promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora ADH unida a la región de activación de la transcripción GAP (Patentes de los EEUU Nº 4876197 y 4880734) Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen los promotores que consisten en las secuencias reguladoras de los genes ADH2, GAL4, GAL10 o PHO5, combinadas con la región de activación de la transcripción de un gen de una enzima glicolítica, tal como GAP o PyK (EP 0 164556) Además, un promotor de levadura puede incluir promotores de ocurrencia natural de un origen distinto de las levaduras que tengan la capacidad de unirse a ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción

Los ejemplos de secuencias terminadoras de la transcripción y otras secuencias de terminación reconocidas por levaduras, tales como aquellas que codifican enzimas glicolíticas, son conocidos por aquellos entrenados en la técnica

Como alternativa, pueden integrarse las construcciones de expresión con un vector de integración en el genoma de la levadura Los vectores de integración típicamente contienen al menos una secuencia homóloga a un

cromosoma de levadura bacteriano que permite que el vector se integre, y preferiblemente contienen dos secuencias homólogas que rodean la construcción de expresión. Las integraciones son el resultado de las recombinaciones entre el ADN homólogo en el vector y el cromosoma de la levadura (Orr-Weaver et al , 1983, Methods in Enzymol , 101 228-245) Puede dirigirse un vector de integración a un locus específico en una levadura, seleccionando la secuencia homóloga apropiada para incluir en el vector Véase Orr-Weaver et al , supra. Una o más construcciones de expresión pueden integrarse y posiblemente afectar los niveles de proteínas recombinantes producidas (Rine et al., 1983, Proc Natl Acad Sci USA, 80·6750). Las secuencias cromosomales incluidas en el vector pueden aparecer como segmentos individuales en el vector, lo que resulta en la integración del vector completo, o como dos segmentos homólogos a segmentos adyacentes en el cromosoma, que rodean la construcción de expresión en el vector, lo que resulta en la expresión estable de la construcción de expresión sola

La presente invención también contempla la transformación de una secuencia de nucleótidos de la presente invención en una planta para lograr niveles de expresión capaces de inhibir plagas de una o más moléculas de dsARN Puede prepararse fácilmente un vector de transformación usando métodos disponibles en la técnica El vector de transformación comprende una o más secuencias de nucleótidos que son capaces de transcribirse en una molécula de ARN, y que son sustancialmente homólogas y/o complementarias con una o más secuencias de nucleótidos codificadas por el genoma del insecto, de modo que, al ingresar el ARN transcripto a partir de una o más secuencias de moléculas de nucleótidos en el insecto, se verifica la regulación negativa de al menos una de las secuencias de nucleótidos respectivas del genoma del insecto

Además, el vector de transformación puede comprender una construcción de dsADN, y también puede considerarse, entre otros, como una molécula recombinante, un agente para controlar insectos, una molécula genética o una construcción genética quimérica. Una construcción quimérica de la presente invención puede comprender, por ejemplo, secuencias de nucleótidos que codifican uno o más transcriptos antisentido, uno o más transcriptos en el sentido del marco de lectura, una o más de cada una de las secuencias mencionadas previamente, donde la totalidad o una parte de un transcripto de ellas es homóloga con la totalidad o una parte de una molécula de ADN que comprende una secuencia de ARN codificada por una secuencia de nucleótidos en el genoma de un insecto

En una realización, el vector de transformación de plantas es una molécula de ADN aislada y purificada, que comprende un promotor unido operativamente a una o más secuencias de nucleótidos de la presente invención La secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias La secuencia de nucleótidos incluye un segmento que codifica la totalidad o una parte de un ARN presente en un transcripto de ARN de la plaga blanco, y puede comprender repeticiones invertidas de la totalidad o parte de un ARN de la plaga blanco La molécula de ADN que comprende el vector de expresión también puede contener la secuencia de un intrón funcional localizada río arriba de la secuencia codificante o aún dentro de la secuencia codificante, y también puede contener una secuencia directriz no traducida (5') (es decir, una UTR o 5'-UTR) localizada entre el promotor y el punto de inicio de la traducción.

Un vector de transformación de plantas puede contener secuencias de más de un gen, lo que permite producir más de un dsARN para inhibir la expresión de dos o más genes en las células de una plaga blanco Aquellos

entrenados en la técnica podrán apreciar fácilmente que pueden combinarse segmentos de ADN, cuya secuencia corresponde a aquella presente en distintos genes, en un único segmento de ADN compuesto, con el fin de expresarlo en una planta transgénica Como alternativa, puede modificarse un plásmido de la presente invención, que ya contiene al menos un segmento de ADN, mediante la inserción consecutiva de segmentos de ADN adicionales entre las secuencias del potenciador, el promotor y el terminador. En el agente para controlar insectos de la presente invención diseñado para inhibir múltiples genes, pueden obtenerse los genes a inhibir de la misma especie de insecto con el fin de mejorar la efectividad del agente para controlar insectos. En determinadas realizaciones, los genes pueden derivar de distintos insectos, con el fin de ampliar el rango de insectos contra los cuales pueda ser efectivo el agente. Cuando se desea suprimir varios genes, o cuando se seleccionan varios genes para expresarlos y suprimirlos en forma combinada, puede fabricarse un elemento de ADN policistrónico como se ilustra y se describe en Fillatti, Publicación de Solicitud de los EEUU Nº 2004-0029283.

Cuando se desea usar una secuencia de nucleótidos de la presente invención para transformar una planta, se selecciona un promotor que presenta la capacidad de dirigir la expresión de la secuencia codificante en la especie de planta en cuestión En la técnica también se conocen promotores que funcionan en distintas especies de plantas Los promotores útiles para expresar polipéptidos en plantas son aquellos que son inducibles, virales, sintéticos o constitutivos, como se describe en Odell *et al.* (1985, Nature 313.810-812), y/o los promotores que están regulados en forma temporal, espacial y espacio-temporal Los promotores preferidos incluyen los promotores mejorados CaMV35S y el promotor FMV35S. Para el propósito de la presente invención, por ejemplo, para obtener un control óptimo de la especie que se alimenta con raíces, es preferible obtener niveles más elevados de expresión de estos genes

en las raíces de las plantas Se han identificado y se conocen en la técnica varios promotores con expresión mejorada en la raíz (Lu et al , 2000, J Plant Phys , 156(2) 277-283, Patentes de los EEUU Nº 5837848 y 6489542) Un vector o una construcción de ADN recombinante de la presente invención típicamente comprenderá un marcador de selección que confiera a las células vegetales un fenotipo que pueda seleccionarse También pueden usarse marcadores de selección para seleccionar plantas o células vegetales que contengan los ácidos nucleicos exógenos que codifican los polipéptidos o las proteínas de la presente invención El marcador puede codificar resistencia a biocidas, resistencia a antibióticos (por ejemplo, kanamicina, G418 bleomicina, hygromicina, etcétera), o resistencia a herbicidas (por ejemplo, glifosato, etcétera) Los ejemplos de marcadores de selección incluyen, sin limitaciones, un gen *neo*, que codifica resistencia a kanamicina y puede seleccionarse usando kanamicina, G418, etcétera, un gen bar, que codifica resistencia a bialaphos; un gen de EPSP sintetasa mutante, que codifica resistencia a glifosato; un gen de nitrilasa, que confiere resistencia a bromoxinil, un gen de acetolactato sintetasa (ALS) mutante, que confiere resistencia a imidazolinona o sulfonilurea; y un gen de DFHR con resistencia a metotrexato.

Un vector o una construcción recombinante de la presente invención también puede incluir un gen marcador de análisis. Los marcadores de análisis pueden usarse para monitorear la expresión Los ejemplos de marcadores de análisis incluyen un gen de β-glucuronidasa o uidA (GUS), que codifica una enzima para la cual se conocen numerosos sustratos cromogénicos (Jefferson, 1987, *Planta Mol. Biol, Rep. 5*:387-405, Jefferson *et al.*, 1987, *EMBO J. 6* 3901-3907), un gen del locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos vegetales (Dellaporta *et al* , 1988, Simposio Stadler *11* 263-282), un gen de β-lactamasa (Sutcliffe *et al* , 1978, *Proc. Natl. Acad Sci. 75*.3737-3741), un gen que codifica una enzima

para la cual se conocen numerosos sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica), un gen de luciferasa (Ow *et al*., 1986, *Science 234*.856-859), un gen xylE (Zukowsky *et al*., 1983, *Proc. Natl Acad. Sci 80*.1101-1105), que codifica una catecol dioxigenasa capaz de convertir catecoles cromogénicos; un gen de α-amilasa (Ikatu *et al*., 1990, *Bio/Technol 8* 241-242), un gen de tirosinasa (Katz *et al*., 1983, *J. Gen Microbiol. 129*:2703-2714), que codifica una enzima capaz de oxidar tirosina en DOPA y dopaquinona, que a su vez se condensa en melanina, y una α-galactosidasa, que cataliza un sustrato cromogénico de α-galactosa

En general, es preferible introducir un ADN recombinante funcional en una localización no específica en el genoma de una planta En casos especiales, puede ser útil insertar una construcción de ADN recombinante mediante integración en sitios específicos Existen varios sistemas de recombinación específica de los que se sabe que funcionan en plantas, incluyendo cre-lox, que se describe en la Patente de los EEUU Nº 4959317, y FLP-FRT, que se describe en la Patente de los EEUU Nº 5527695.

En la práctica, se introduce ADN solamente en un pequeño porcentaje de las células blanco en un único experimento de transformación Los genes que codifican marcadores de selección se usan para proporcionar un sistema eficiente para identificar aquellas células transformadas en forma estable, que comprende recibir e integrar una construcción de ADN transgénico en su genoma. Los genes marcadores preferidos proporcionan marcadores de selección que confieren resistencia a un agente de selección, tal como un antibiótico o un herbicida. Cualquiera de los herbicidas a los cuales puedan ser resistentes las plantas de esta invención serán agentes útiles como marcadores de selección. Las células potencialmente transformadas se exponen al agente de selección La población de células sobrevivientes comprenderá aquellas células donde, en general, el gen que confiere

resistencia se haya integrado y se exprese a niveles suficientes para permitir la supervivencia de las células Pueden evaluarse adicionalmente las células para confirmar la integración estable del ADN exógeno Los genes marcadores de selección de uso común incluyen aquellos que confieren resistencia a antibióticos, tales como kanamicina (*nptII*), higromicina B (*aph IV*) y gentamicina (*aac3* y *aac*C4), o resistencia/tolerancia a herbicidas, tales como glufosinato (*bar o pat*), glifosato (EPSPS) y AMPA (*phn*O) Se ilustran ejemplos de estos marcadores de selección en las Patentes de los EEUU Nº 5550318, 5633435, 5780708 y 6118047 También pueden emplearse marcadores de análisis que proporcionan la capacidad de identificar transformantes por medios visuales, *por ejemplo*, un gen que expresa una proteína coloreada o fluorescente, tal como la luciferasa o la proteína fluorescente verde (GFP), un gen que expresa una *beta*-glucuronidasa o un gen *uid*A (GUS), para el cual se conocen varios sustratos cromogénicos.

Los vectores de transformación de plantas preferidos incluyen aquellos derivados de un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (por ejemplo, Patentes de los EEUU Nº 4536475, 4693977, 4886937, 5501967 y EP 0 122 791). Los plásmidos de *Agrobacterium rhizogenes* (o "Ri") también son útiles y conocidos en la técnica Otros vectores de transformación de plantas preferidos incluyen aquellos descriptos, *por ejemplo*, por Herrera-Estrella (1983, Nature 303.209-213), Bevan (1983, Nature 304.184-187), Klee (1985, Bio/Technol 3.637-642) y EP 0 120 516

Los métodos y las composiciones para transformar plantas que comprenden introducir una construcción de ADN recombinante en el genoma de una planta incluyen cualquiera de una cantidad de métodos conocidos en la técnica Un método para construir plantas transformadas es el bombardeo de microproyectiles, como se ilustra en las Patentes de los EEUU Nº 5015580, 5550318, 5538880, 6153812, 6160208, 6288312 y 6399861. Otro método para

construir plantas transformadas es la transformación mediada por *Agrobacterium*, como se ilustra en las Patentes de los EEUU Nº 5159135, 5824877, 5591616 y 6384301 Como alternativa, pueden usarse otras especies distintas de *Agrobacterium*, tales como, *Rhizobium*, y otras células procariotas que presentan la capacidad de infectar células vegetales e introducir secuencias de nucleótidos heterólogas en el genoma de las células vegetales infectadas.

Las construcciones de ADN de la presente invención pueden introducirse en el genoma de una planta huésped deseada empleando una variedad de procedimientos de transformación convencionales que son bien conocidos por aquellos entrenados en la técnica Los vectores de transformación de plantas apropiados para efectuar la transformación mediada por *Agrobacterium* incluyen aquellos derivados de un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* Además de los vectores de transformación de plantas mediados por *Agrobacterium*, pueden usarse otros métodos para insertar las construcciones de ADN de la presente invención en células vegetales Estos métodos pueden comprender, sin limitaciones, por ejemplo, el uso de liposomas, electroporación, sustancias químicas que incrementan la asimilación de ADN, administración de ADN libre por bombardeo de microproyectiles, y transformación usando virus o polen

Puede introducirse cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos aisladas de la presente invención en una célula vegetal, de forma permanente o transitoria, en combinación con otros elementos genéticos, tales como promotores, intrones, potenciadores y secuencias directrices no traducidas, etcétera. Cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican ARN de una especie de coleóptero o ARN de una especie de insecto perforador o succionador, o preferiblemente ARN de *D. v virgifera* o ARN de *Lygus hesperus*, puede fabricarse e introducirse en una célula vegetal de modo tal

que permita producir moléculas de dsARN dentro de la célula vegetal, lo que proporcionará una cantidad insecticida de uno o más dsARN particulares en la dieta del insecto plaga blanco

El término "célula vegetal transgénica" o "planta transgénica" hace referencia a una célula vegetal o una planta que contiene un ácido nucleico exógeno, que puede derivar de WCR o de una especie de insecto diferente o de otra especie que no sea un insecto Las plantas transgénicas también comprenden la progenie (descendencia, crías, etcétera) de cualquier generación de dicha planta transgénica, o una semilla de cualquier generación de dichas plantas transgénicas, donde dicha progenie o dicha semilla comprende una secuencia de ADN que codifica el ARN, el sARN, el dsARN, el siARN o el fragmento de éste de la presente invención, y también constituyen un aspecto importante de la invención

Una planta transgénica formada usando métodos de transformación con *Agrobacterium* típicamente contiene una única secuencia simple de ADN recombinante insertada en un cromosoma, y se conoce como un evento transgénico Estas plantas transgénicas pueden denominarse heterocigotas para la secuencia exógena insertada. Puede obtenerse una planta transgénica homocigota respecto de un transgen cruzando por vía sexual (autocruzando) una planta transgénica segregante independiente que contiene una única secuencia genética exógena consigo misma, por ejemplo, una planta F0, para producir semillas F1 Un cuarto de las semillas F1 producidas serán heterocigotas para el transgen La germinación de las semillas F1 resulta en plantas en las que puede evaluarse la heterocigosis, típicamente usando un ensayo SNP o un ensayo de amplificación térmica que permita distinguir entre heterocigotas y homocigotas (es decir, un ensayo de cigosidad). El cruzamiento de una planta heterocigota consigo misma o con otra planta heterocigota resulta solamente en progenie heterocigota.

Además de la transformación directa de una planta con una construcción de ADN recombinante, pueden prepararse plantas transgénicas cruzando una primera planta con una construcción de ADN recombinante con una segunda planta que carece de la construcción. Por ejemplo, puede introducirse ADN recombinante para la supresión genética en una primera línea vegetal que puede transformarse para producir una planta transgénica, que puede cruzarse con una segunda línea vegetal con el objeto de introducir el ADN recombinante para la supresión genética en la segunda línea vegetal.

Las plantas transgénicas que pueden generarse al poner en práctica la presente invención incluyen, sin limitaciones, alfalfa, anet, manzana, albaricoque, alcaucil, arúgula, espárrago, avocado, banana, cebada, poroto, yute, zarzamora, arándano, brócoli, repollo de Bruselas, col, canola, cantalupe, zanahoria, casava, coliflor, apio, cereza, cilantro, pomelo, clementina, café, maní, algodón, pepino, abeto Douglas, berenjena, endivia, escarola, eucalipto, hinojo, higo, calabaza, uva, ananá, rocío de miel, jicama, kiwi, lechuga, puerro, limón, lima, pino Loblolly, mango, melón, hongo, nuez, avena, okra, cebolla, naranja, una planta ornamental, papaya, perejil, arveja, durazno, maní, pera, pimienta, caqui, pino, piña, plátano, ciruela, granada, acero, papa, calabaza, membrillo, pino radiado, radicheta, rábano, frambuesa, arroz, centeno, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, zapallo, frutilla, remolacha, caña de azúcar, girasol, batata, goma dulce, mandarina, té, tabaco, tomate, pasto, una viña, sandía, trigo, ñame y repollito

En la práctica, la presente invención puede combinarse con otros caracteres para controlar insectos en una planta, con el fin de obtener caracteres para mejorar el control de infestaciones de insectos La combinación de caracteres para controlar insectos que emplean distintos modos de acción puede proporcionar plantas transgénicas protegidas de los insectos con mayor durabilidad, respecto de las plantas que contienen un único carácter para

controlar insectos, debido a la menor probabilidad de que se desarrolle resistencia en el campo

El mecanismo de la actividad insecticida de las proteínas cristalinas de *B thuringiensis* ha sido estudiado en forma extensa en la década pasada. Se ha demostrado que las proteínas cristalinas son tóxicas para la forma larval del insecto solamente después de la ingestión de la proteína En larvas de lepidópteros, un pH alcalino y las enzimas proteolíticas en el mesenterón del insecto solubilizan las proteínas, lo que permite liberar los componentes que son tóxicos para el insecto Estos componentes tóxicos destruyen las células del mesenterón, lo que hace que el insecto deje de alimentarse y, eventualmente, lo lleva a la muerte Por esta razón, las toxinas de *B thuringiensis* han probado ser insecticidas efectivos y seguros desde el punto de vista ambiental para lidiar con varios insectos plaga. Los insectos coleópteros y hemípteros, y probablemente los insectos dípteros, *Lygus* y otros insectos perforadores y succionadores, presentan un pH en el mesenterón que es ligeramente ácido, de modo que las toxinas Bt que son efectivas contra larvas de lepidópteros no son efectivas contra estas plagas También se cree que el pH ligeramente ácido del mesenterón de estos insectos es más favorable para las composiciones de la presente invención, y sin pretender apoyar una teoría en particular, es probable que el pH alcalino de las larvas de lepidópteros sea la razón por la cual han fallado los intentos anteriores de demostrar la eficacia del dsARN (Fire et al Patente de los EEUU Nº 6506559, Mesa et al Publicación de Patente Nº US2003/0150017, Rajagopal et al , 2002, J Biol Chem 277:46849-46851, Tabara et al , 1998, Science 282 430-431) Por consiguiente, se cree que los métodos de dsARN descriptos en la presente documentación deberán usarse preferiblemente en composiciones y en plantas para controlar coleópteros, dípteros, hemípteros, *Lygus* e insectos perforadores y succionadores Los métodos y las composiciones detalladas en la presente

documentación son particularmente útiles para provocar la supresión de genes en insectos con un pH en el mesenterón de entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 9,5, o entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 9,0, o entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 8,5, o entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0, o entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,7, o entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,6, o aproximadamente 7,0 Sin embargo, los insectos y otras especies de plagas con un pH intestinal de entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 11,5, o entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 11,0, o entre aproximadamente 9,0 y aproximadamente 10,0, tales como las larvas de insectos lepidópteros, también están dentro del alcance de la presente invención Esto es particularmente verdadero cuando se introduce un dsARN específico para inhibir un gen en una larva de lepidóptero en la dieta de la larva, en combinación con una o más proteínas Bt, que, respecto de la proteína Bt, serían comúnmente tóxicas para dicha larva de lepidóptero al suministrarse a un nivel igual o superior que el umbral La presencia de una o más toxinas Bt tóxicas para la misma especie de insecto reducirá efectivamente el pH del mesenterón, lo que proporcionará un ambiente estable para que las moléculas de ARN de cadena doble ejerzan sus efectos de supresión de genes blanco en el insecto plaga.

Será útil combinar una o más construcciones de dsARN estabilizadas que produzcan las moléculas de dsARN de la presente invención, en la dieta de un insecto plaga blanco, en combinación con una o más proteínas insecticidas, de modo tal que el dsARN y la proteína insecticida sean tóxicos para el mismo insecto plaga. La proteína insecticida podrá derivar de *B. thuringiensis*, pero también de otros organismos conocidos en la técnica por producir proteínas insecticidas, tales como los simbiontes bacterianos de nematodes entomopatogénicos (por ejemplo, *Photorhabdus* sp , *Xenorhabdus* sp.), *Serratia entomophila* y especies relacionadas con *Serratia*, *B. sphaericus*,

B cereus, *B laterosporus*, *B. popilliae*, *Clostridium bifermentans*, u otras bacterias gram positivas formadoras de esporas que presenten propiedades insecticidas. Del mismo modo, se contempla que puedan proporcionarse dos o más construcciones de dsARN estabilizadas diferentes, que produzcan moléculas de dsARN de la presente invención, dentro de una misma planta, con el objeto de asegurar la durabilidad del fenotipo para controla insectos Estas moléculas de dsARN podrán estar dirigidas al silenciamiento del mismo gen, o como alternativa, podrán estar dirigidas al silenciamiento de distintos genes Podrán combinarse dos o más dsARN diferentes en la misma planta, donde cada dsARN será tóxico para un insecto plaga diferente y ninguno de los dsARN será tóxico para la misma especie de insecto

Se anticipa que la combinación de determinadas construcciones de dsARN estabilizadas con uno o más genes para controlar proteínas de insectos resultará en sinergismos que mejorarán el fenotipo para controlar insectos de una planta transgénica Pueden usarse ensayos biológicos en insectos que empleen dietas artificiales o tejido vegetal completo para definir las respuestas a la dosis, en lo referente a la mortalidad o la inhibición del crecimiento de las larvas, usando dsARN y proteínas para controlar insectos. Aquellos entrenados en la técnica podrán evaluar mezclas de moléculas de dsARN y proteínas para controlar insectos en ensayos biológicos, con el fin de identificar combinaciones que sean sinergísticas y deseables para introducir en plantas con protección contra insectos (Tabashnik, 1992) Se ha descripto el sinergismo entre distintas proteínas para controlar insectos en la eliminación de insectos plaga (para hallar una revisión, véase Schnepf *et al*, 1998) Se anticipa la existencia de sinergismos entre determinados dsARN y entre determinados dsARN y determinadas proteínas para controlar insectos

También se anticipa que las combinaciones de dsARN revelen una toxicidad inesperada para determinados insectos plaga. Rajagopol *et al* (2002,

J Biol Chem. 277 46849-46851) informaron que la alimentación de larvas del lepidóptero plaga *S. litura* con dsARN no era efectiva para silenciar un gen que codificaba una aminopeptidasa del mesenterón Vale destacar que el ambiente con pH alcalino del mesenterón típico de los lepidópteros puede ser un ambiente hostil para los dsARN, ya que se espera que la desnaturalización de los dobletes de ARN a pH alcalino conduzca a una degradación rápida Los poros formados por las proteínas tóxicas de *B thuringiensis* insertadas en la membrana epitelial del mesenterón resultan en una neutralización del pH del mesenterón (revisado en Gill, 1995, Mem. Inst. Osaldo Cruz, Río de Janeiro, 90 69-74) Por consiguiente, las proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* que solamente son capaces de formar canales de iones transitorios en la membrana epitelial del mesenterón de los lepidópteros sin causar la mortalidad serán suficientes para reducir el pH del mesenterón hasta niveles más apropiados para la asimilación del dsARN por las células epiteliales del mesenterón. A modo de ejemplo, se sabe que la proteína Cry1Ac no es una toxina efectiva contra la oruga marchadora del yute *Spodoptera exigua* (Chambers *et al*, 1991, J Bacteriol 173 3966-3976) Aún así, las reducciones transitorias del pH del mesenterón causadas por la proteína Cry1Ac podrían servir para estabilizar los dsARN co-ingeridos y hacerlos efectivos para silenciar genes blanco en *S. exigua*, lo que proporcionaría un medio inesperado para controlar los insectos plaga Este efecto podría observarse con cualquier proteína, insecticida o no, que alterara la regulación iónica de las células del mesenterón de los insectos lepidópteros, y también podría ser efectivo en coleópteros, dípteros, hemípteros, chinches *Lygus* y otros insectos perforadores y succionadores, y semejantes.

Algunas proteínas insecticidas de *B thuringiensis*, tales como las proteínas Cyt, pueden provocar aberturas transitorias en la membrana epitelial del mesenterón de larvas de insectos sensibles, debido a la formación de poros

estructurales o a la actividad general tipo detergente de la proteína (Butko, 2003, Appl. Environ Microbiol 69:2415-2422) Estas aberturas podrían facilitar el pasaje de las moléculas de dsARN hacia las células epiteliales del mesenterón, aún a concentraciones de proteínas que fueran sub-óptimas para provocar mortalidad. Se anticipa que cualquier proteína, insecticida o no, que provoque aberturas transitorias en las membranas epitelial de insectos, podrá facilitar el pasaje de moléculas de dsARN hacia las células de los insectos y promoverá el silenciamiento genético

Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 o SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, como se detalla en el listado de secuencias, fragmentos de éstas, o complementos de éstas, podrán "introducirse" en una variedad de medios para facilitar su uso Este medio también podrá proporcionar un subconjunto de éstas, en una forma que permita que aquellos entrenados en la técnica examinen las secuencias.

Los productos primarios comerciales que contienen una o más las secuencias de la presente invención, producidos a partir de una planta o una semilla recombinante que contiene una o más de las secuencias de nucleótidos de la presente invención, están específicamente contemplados como realizaciones de la presente invención. Un producto primario comercial que contiene una o más de las secuencias de la presente invención incluye, sin limitaciones, alimentos, aceites, granos o semillas de una planta completas o molidas, o cualquier producto alimenticio que comprenda cualquier alimento, aceite o grano completo o molido de una planta recombinante, o una semilla que contenga una o más de las secuencias de la presente invención. De hecho, la detección de una o más de las secuencias de la presente invención en uno o más productos primarios o productos derivados comerciales contemplados en la presente documentación es evidencia de que el producto primario o el producto derivado comercial está preparado a partir de una planta

transgénica modificada para que exprese una o más de las secuencias de nucleótidos de la presente invención, con el propósito de controlar infestaciones de insectos usando métodos de supresión genética mediados por dsARN.

En una aplicación de esta realización, puede registrarse una secuencia de nucleótidos de la presente invención en un medio que puede ser leído por una computadora Como se lo usa, "un medio que puede ser leído por una computadora" designa cualquier medio de expresión tangible que pueda ser leído y al que pueda acceder fácilmente una computadora Estos medios incluyen, sin limitaciones medios de almacenamiento magnético, tales como discos extraíbles, discos rígidos, medios de almacenamiento y cintas magnéticas medios de almacenamiento óptico tales como CD-ROM, medios de almacenamiento eléctrico tales como RAM y ROM; archivos informáticos con formato de reconocimiento óptico de caracteres, e híbridos de estas tres categorías, tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos Aquellos entrenados en la técnica podrán apreciar fácilmente que puede usarse cualquiera de los medios que pueden ser leídos por una computadora en la actualidad para crear una construcción que comprenda un medio que puede ser leído por una computadora que tenga registrada una secuencia de nucleótidos de la presente invención.

Como se lo usa en la presente documentación, el "registro" designa un proceso para almacenar información en un medio que puede ser leído por una computadora. Aquellos entrenados en la técnica podrán adoptar fácilmente los métodos conocidos actualmente para registrar información en un medio que puede ser leído por una computadora, con el objeto de generar medios que comprendan la información de secuencia de nucleótidos de la presente invención Existe una variedad de estructuras de almacenamiento de datos disponibles para que aquellos entrenados en la técnica creen un medio que

puede ser leído por una computadora que tenga registrada una secuencia de nucleótidos de la presente invención La elección de la estructura de almacenamiento de datos estará generalmente basada en el medio elegido para acceder a la información almacenada Además, puede usarse una variedad de programas de procesamiento de datos y formatos para almacenar la información de secuencia de nucleótidos de la presente invención en un medio que puede ser leído por una computadora La información de secuencia puede estar representada en un archivo de texto de un procesador de palabras con un formato proporcionado por un software disponible comercialmente, tal como WordPerfect y Microsoft Word, o puede estar representada bajo la forma de un archivo de texto ASCII, almacenado en una aplicación de base de datos, tal como DB2, Sybase, Oracle o semejantes. Aquellos entrenados en la técnica podrán adaptar fácilmente cualquier cantidad de formatos de estructuras de procesadores de datos (por ejemplo, archivos de texto o de bases de datos) para obtener un medio que pueda ser leído por una computadora que tenga registrada la información de secuencia de nucleótidos de la presente invención

Existe software de análisis informático disponible para el público que permite que aquellos entrenados en la técnica accedan a la información de secuencia proporcionada en un medio que puede ser leído por una computadora. Puede usarse un software que implemente los algoritmos de búsqueda BLAST (Altschul *et al., J Mol. Biol. 215:* 403-410 (1990)) y BLAZE (Brutlag, *et al., Comp Chem. 17.* 203-207 (1993)) sobre un sistema Sybase para identificar marcos abiertos de lectura (ORF) dentro de secuencias, tales como las Unigenes y las EST que se proporcionan en la presente documentación, que presenten homología con ORF o proteínas de otros organismos Estos ORF son fragmentos que codifican proteínas dentro de las secuencias de la presente invención, y son útiles para producir proteínas de importancia comercial, tales como las enzimas usadas en la biosíntesis de

aminoácidos, el metabolismo, la transcripción, la traducción, el procesamiento de ARN, la degradación de ácidos nucleicos y proteínas, la modificación de proteínas y la replicación, la restricción, la modificación y la reparación del ADN

Además, la presente invención provee sistemas, particularmente sistemas basados en computadora, que contienen la información de secuencia descripta en la presente documentación. Estos sistemas están diseñados para identificar fragmentos de importancia comercial de la molécula de ácido nucleico de la presente invención Como se lo usa en la presente documentación, "un sistema basado en computadora" designa medios de hardware, medios de software y medios para almacenar datos usados para analizar la información de secuencia de nucleótidos de la presente invención Los medios de hardware mínimos para los sistemas basados en computadoras de la presente invención comprenden una unidad de procesamiento central (CPU), medios de entrada, medios de salida y medios de almacenamiento de datos Aquellos entrenados en la técnica podrán apreciar fácilmente que cualquier sistema basado en computadora disponible en la actualidad será apropiado para usar en la presente invención

La longitud de secuencia más preferida para una secuencia blanco es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 aminoácidos, o entre aproximadamente 23 y aproximadamente 300 residuos de nucleótidos

Como se lo usa en la presente documentación, "un motivo estructural blanco" o "un motivo blanco" designa cualquier secuencia o combinación de secuencias seleccionada en forma racional donde se seleccionen la o las secuencias sobre la base de una configuración tridimensional que se forme al plegarse el motivo blanco. Existe una variedad de motivos blanco conocidos en la técnica. Los motivos proteicos blanco incluyen, sin limitaciones, sitios enzimáticos activos y secuencias señal Los motivos de ácidos nucleicos

blanco incluyen, sin limitaciones, secuencias promotoras, elementos cis, estructuras de hebilla y elementos de expresión inducible (secuencias de unión a proteínas).

EJEMPLOS

Los inventores de la presente han identificado un medio para controlar una infestación por una plaga de invertebrados que comprende la provisión de una molécula de ácido ribonucleico de cadena doble en la dieta de la plaga Sorpresivamente, los inventores han descubierto que la molécula de ácido ribonucleico de cadena doble, luego de su ingestión por la plaga, inhibe una función biológica en la plaga, dando como resultado uno o más de los siguientes atributos reducción de la alimentación por la plaga, reducción de la viabilidad de la plaga, muerte de la plaga, inhibición de la diferenciación y el desarrollo de la plaga, ausencia o capacidad reducida para la reproducción sexual de la plaga, formación de músculos, formación de la hormona juvenil, regulación de la hormona juvenil, regulación y transporte de iones, mantenimiento del potencial de membrana de las células, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación de esperma, síntesis de feromonas, percepción de feromonas, formación de antenas, formación de alas, formación de patas, desarrollo y diferenciación, formación de huevos, maduración de larvas, formación de enzimas digestiva, síntesis de la hemolinfa, mantenimiento de la hemolinfa, neurotransmisión, división celular, metabolismo energético, respiración, apoptosis y cualquier componente de la estructura del citoesqueleto de las células eucariotas, tal como, por ejemplo, actinas y tubulinas Cualquiera o cualquier combinación de estos atributos puede dar como resultado una inhibición eficaz de la infestación por la plaga y, en el caso de una plaga de plantas, la inhibición de la infestación de las plantas Por ejemplo, cuando se usa como una composición de dieta que contiene una cantidad suficiente para inhibir una plaga de una o más moléculas de ácido

ribonucleico de cadena doble administradas a la planta como un tópico, como un tratamiento, como una aplicación a la tierra alrededor de la planta, o cuando es producida por una planta a partir de una molécula de ADN recombinante presente dentro de las células de una planta, la infestación por la plaga de plantas se reduce inesperada y dramáticamente Los ejemplos que se ofrecen en la presente son ilustrativos de la invención cuando se aplican a una sola plaga Sin embargo, el especialista comprenderá que los métodos, las fórmulas y las ideas presentados en los ejemplos no pretenden ser limitativos y son aplicables a todas las especies de plagas de invertebrados que puedan consumir fuentes de alimentos que se puedan formular para contener una cantidad suficiente de un agente inhibidor de una plaga que consiste de al menos una o más de las moléculas de ARN de cadena doble descritas en la presente como ejemplo para suprimir alguna característica esencial o función de la plaga.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la identificación de secuencias de nucleótidos que, cuando se proveen en la forma de moléculas de ARN de cadena doble en la dieta de un gusano de la raíz de maíz, son de utilidad para controlar dichos gusanos.

Se construyeron bibliotecas de ADNc de gusano de la raíz de maíz (LIB149, LIB 150, LIB3027, LIB3373) a partir de larvas completas y secciones de intestino disecadas, y se obtuvo información sobre las secuencias de nucleótidos (véase Andersen et al , Solicitud de Patente de EE UU Nº. 10/205 189, presentada el 24 de julio, 2002, cuyo contenido se incorpora específicamente y por completo en este documento a modo de referencia) Además, se construyeron bibliotecas de ADNc a partir de larvas completas en diferentes etapas del desarrollo y en diferente tiempos dentro de cada etapa del desarrollo con el fin de maximizar la cantidad de secuencias de EST diferentes

de la especie *Diabrotica*. Las bibliotecas LIB5444 y LIB5462 se construyeron, respectivamente, a partir de agrupaciones del ARNm obtenido del primer (1 gramo) y tercer (2,9 gramos) instar de larvas del gusano de la raíz de maíz del oeste Los insectos cosechados fueron congelados rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido Los insectos fueron molidos en mortero y luego se conservaron–20 °C o menos por enfriamiento sobre hielo seco y/o con la adición de nitrógeno líquido al mortero hasta que el tejido había sido molido en un polvo fino El ARN se extrajo usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El ARN poli A+ se aisló de las preparaciones de ARN total usando Dynabeads Oligo dT (Dynal Inc , NY) según las instrucciones del proveedor. Se construyó una biblioteca de ADNc a partir del ARN Poli A+ usando el Sistema de Plásmidos SuperScript™ (Invitrogen). El ADNc se fraccionó por tamaño usando cromatografía Se recolectaron las fracciones cuarta y quinta y se ligaron en el vector pSPORT1 (Life Technologies Inc , Gaithersburg MD) entre los sitios de reconocimiento de las endonucleasas de restricción *Sal*1 y *Not*1, y luego se transformaron en células electro-competentes DH10B de *E. coli* por electroporación. La biblioteca de larvas del primer instar permitió obtener aproximadamente 420 000 unidades formadoras de colonias La biblioteca de larvas en el tercer instar permitió obtener aproximadamente 2,78 x 10^6 unidades formadoras de colonias Las colonias de LIB149, LIB150 se lavaron de las placas, se mezclaron brevemente hasta homogeneidad por vortexeo y se agruparon en solución amortiguadora Tris-EDTA La mitad del lavado se llevó a glicerol 10%, se separó en alícuotas en crioviales y luego se guardaron a –70 °C La otra mitad se usó para producir ADN plasmídico usando una columna de purificación Quiagen midi-prep, o un equivalente de la misma El ADN plasmídico purificado se separó en alícuotas en tubos para microcentrífuga y luego se guardaron a –20 °C.

Se amplificaron colonias individuales de las bibliotecas de ADNc LIB5444 y LIB5462 de *Diabrotica virgifera* en un medio de gran viscosidad Se mezclaron aproximadamente 200 000 unidades formadoras de colonias de LIB5444 y 600.000 unidades formadoras de colonias de LIB5462 sobre una placa de agitación por separado en 500 ml de medio LB que contenía agarosa® SeaPrep 0,3% y carbenecilina 50 mg/l a 37 °C y luego se enfrió rápidamente en un baño de agua/hielo durante 1 hora para obtener una suspensión uniforme de las colonias bacterianas Las bibliotecas inoculadas se cultivaron luego a 30 °C durante 42 horas. Después de la incubación, las células se mezclaron durante 5 minutos sobre una placa de agitación El medio fue transferido luego a dos botellas para centrífuga de 250 ml. Las células bacterianas fueron agrupadas en pelets a 10,000 x g durante 10 minutos El medio se retiró de las botellas y las células se volvieron a suspender en un total de 20 ml de medio LB con carbenecilina 50 mg/l. Se agregó dimetilsulfóxido 10% para conservar las células congeladas Ambas bibliotecas se amplificaron hasta un título final de 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro Se combinaron las muestras de las bibliotecas de ADNc LIB5444 y LIB5462 de *Diabrotica virgifera* y se ajustaron hasta una concentración de ADN de aproximadamente 1,25 microgramos por microlitro en agua desionizada y destilada estéril y se separaron en alícuotas en veinticinco criovíales, donde cada criovial contenía aproximadamente 8,75 microgramos de ADN Estas muestras fueron depositadas por los Solicitantes/Inventores con *American Type Culture Collection* (ATCC) con domicilio en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, EE.UU. ZIP 20110-2209 el 10 de junio, 2004, y se les denominó LIB5444/62 El ATCC le proporcionó un recibo de depósito al Solicitante, asignándole el Nº Acceso de depósito den ATCC, PTA-6072

Las bibliotecas de ADNc de alto peso molecular del gusano de la raíz de maíz, es decir, LIB5496 y LIB5498, se prepararon esencialmente como se

describió precedentemente para la producción de las bibliotecas de ADNc de gusano de la raíz de maíz Las bibliotecas LIB5496 y LIB5498 se construyeron, respectivamente, a partir de agrupaciones de ARNm obtenidas del primer (1 gramo) y segundo y tercer (1 gramo) instar de larvas del gusano de la raíz de maíz del oeste. Brevemente, los insectos fueron congelados rápidamente en nitrógeno líquido. Los insectos congelados fueron reducidos a un polvo fino por molienda en mortero. El ARN se extrajo usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen) según las instrucciones del proveedor El ARN poli A+ se aisló de la preparación de ARN total usando Dynabeads Oligo dT (Dynal Inc., NY) Se obtuvo una biblioteca de ADNc de alto peso molecular a partir de 20 microgramos de ARN poli A+ usando el Sistema para Plásmidos SuperScript™ (Invitrogen) El ADNc se fraccionó por tamaño sobre un gel de agarosa 1% en TAE, y se recolectó el ADNc del rango entre 1 Kb y 10 Kb, se ligó en el vector pSPORT1 entre los sitios de restricción *Sal*1 y *Not*1 y luego se transformó en células DH10B electrocompetentes de *E coli* por electroporación La biblioteca LIB5496 permitió obtener un título total de aproximadamente 3,5 x 10^6 unidades formadoras de colonias. La biblioteca LIB5498 permitió obtener un título total de aproximadamente 1,0 x 10^6 unidades formadoras de colonias Las colonias de las bibliotecas de ADNc de alto peso molecular del gusano de la raíz de maíz, LIB5496 y LIB5498, se amplificaron individualmente en un medio de gran viscosidad. Se mezclaron aproximadamente 600 000 unidades formadoras de colonias de LIB5496 y LIB5498 sobre una placa de agitación por separado en 500 ml de medio LB que contenía agarosa SeaPrep® 0,3% y carbenecilina 50 mg/l a 37 °C y luego se enfrió rápidamente en un baño de agua/hielo durante 1 hora para obtener una suspensión uniforme de las colonias bacterianas Las bibliotecas se cultivaron luego a 30 °C durante 42 horas. Después de la incubación, las células se mezclaron durante 5 minutos sobre una placa de agitación El medio fue transferido luego a dos botellas para

centrífuga de 250 ml Las células bacterianas fueron agrupadas en pelets a 10 000 x g durante 10 minutos. El medio se retiró de las botellas y las células se volvieron a suspender en un total de 20 ml de medio LB con carbenecilina 50 mg/l Se agregó dimetilsulfóxido 10% para conservar las células por congelamiento Ambas bibliotecas se amplificaron hasta un título final de 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro La información sobre la secuencia de ADNc insertada se obtuvo de bibliotecas de plásmidos específicas de la especie de gusano de la raíz de maíz

Las bibliotecas de gusanos de la raíz de Andersen et al junto con secuencias adicionales de las bibliotecas LIB5444 y LIB5462 produjeron inicialmente 18.415 secuencias EST individuales aproximadamente, que consistían de aproximadamente 1,0 x 10^7 residuos de nucleótidos La longitud promedio de una secuencia EST era de aproximadamente 586 residuos de nucleótidos Estas secuencias EST fueron sometidas a algoritmos bioinformáticos que dieron como resultado el ensamblaje de secuencias contig, en la presente denominadas secuencias UNIGENE, y secuencias EST individuales que no pudieron ser compiladas por identidad superpuesta con otras secuencias EST, en la presente denominadas *singletons*. Las bibliotecas LIB5444 y LIB5462 fueron secuenciadas luego con mayor detalle, obteniéndose como resultado secuencias EST individuales adicionales. Las secuencias EST obtenidas de las bibliotecas, es decir, de LIB149, LIB150, LIB3027, LIB3373, LIB5444, LIB5462, LIB5496 y LIB5503, se muestran en el listado de secuencias desde la SEQ ID Nº 1 hasta la SEQ ID Nº 143 y desde la SEQ ID Nº 169 hasta la SEQ ID Nº 174.

Las secuencias EST aisladas de las bibliotecas de ADNc de CRW fueron ensambladas, cuando era posible, en los conjuntos UNIGENE y estas secuencias ensambladas Unigene están enumeradas en el listado de secuencias Un UNIGENE es una agrupación orientada a

genes formada a partir de la superposición de secuencias EST individuales dentro de regiones de identidad de secuencia para formar una secuencia mayor Pontius et al., *Nucl Acids Res* 31 28-33 (2003) Se analizó cada secuencia de nucleótidos que se muestra en el listado de secuencias para identificar la presencia de marcos de lectura abiertos. La información sobre las secuencias de aminoácidos deducida a partir de los marcos de lectura abiertos se comparó con la información de secuencias de aminoácidos conocidas disponibles en las bases de datos públicas con el fin de deducir la extensión de la identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas. Se anotó la función biológica, si alguna, asociada con las secuencias de aminoácidos en las bases de datos públicas para las secuencias de aminoácidos deducidas de la información sobre las secuencias de nucleótidos de las biblioteca de ADNc Las anotaciones proporcionaron información que sugería la función de la proteína que se podía expresar a partir de un gen particular que originaba una secuencia particular de ADNc, pero no era determinante del resultado. Sobre la base de esta información sugerida en las anotaciones, se caracterizaron determinadas secuencias de ADNc como las que codifican una proteína que muy probablemente estaba comprometida en alguna función biológica dentro de las células del gusano de la raíz de maíz que ya sea era esencial para la vida o era necesaria para asegurar la salud y vitalidad de una célula o que estaría comprometida en la integridad celular, el mantenimiento de la célula, la capacidad reproductora y semejantes.

Se seleccionaron varias secuencias de ADNc a partir de este subconjunto de secuencias de ADNc que codificarían proteínas cuya inhibición probablemente de causaría morbilidad o mortalidad en los CRW o en las células de otras especies de invertebrados Estas secuencias se usaron luego en la construcción de moléculas de ARN de cadena doble para su incorporación en la dieta de los CRW

Se diseñaron pares de cebadores para la amplificación térmica basado en las secuencias de ADNc descritas en la biblioteca de ADNc de CRW Los pares de cebadores se construyeron ya sea como un par de secuencias de nucleótidos, donde cada miembro de un par de cebadores presentaba una complementariedad perfecta con una secuencia orientada en el sentido del marco de lectura o antisentido Algunas secuencias del par de cebadores se construyeron de modo tal que cada miembro del par exhibía una secuencia que contenía un promotor de la ARN polimerasa del fago T7 por su extremo 5' como se muestra, por ejemplo, en la SEQ ID Nº. 5 desde la posición de nucleótido 1 hasta la posición de nucleótido 23. Preferentemente se conducía una primera reacción de amplificación de mayor fidelidad usando un primer par de cebadores que no contenía al promotor T7 para generar un primer amplicón usando ADN genómico de CRW como templado Se utiliza, preferentemente, una secuencia de ADNc o ARNm como templado para la síntesis de una molécula de ARNds que se usará en la presente invención porque se reconoce en el arte que las secuencias genómicas de eucariotas contienen secuencias que no están presentes en la molécula de ARN madura Después se usó una muestra del primer amplicón generado en dicha primera reacción de amplificación de mayor fidelidad como templado en una segunda reacción de amplificación térmica con un segundo par de cebadores que contiene a la secuencia del promotor T7 para producir un segundo amplicón que contiene a dicho promotor T7 cerca del extremo 5', o incluido en el mismo, de cada cadena del segundo amplicón Se obtuvo la secuencia de nucleótidos completa del segundo amplicón en ambas direcciones y se comparó con la secuencia de nucleótidos informada para el ADNc, y se registraron las discrepancias entre las dos secuencias, si había alguna. En general, las secuencias que se prepararon usando ADN genómico como templado eran incoherentes con su uso posterior como moléculas de ARNds para obtener niveles significativos de

supresión debido a las variaciones dentro de las secuencias genómicas que no se observaban en las secuencias de ARNm o ADNc

Una reacción de transcripción *in vitro* contenía típicamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 microgramos de templado de ADN linealizado, solución amortiguadora de reacción de polimerasa T7 de un concentrado 10X, los ribonucleótidos ATP, CTP, GTP y UTP a una concentración final entre 50 y 100 mM cada uno y 1 unidad de enzima ARN polimerasa T7. La reacción de ARN polimerasa se incubó a 37 °C aproximadamente, dependiendo de la temperatura óptima de la ARN polimerasa usada de acuerdo con las instrucciones del proveedor, por un período de tiempo que variaba en un rango entre varios minutos y varias horas En general, las reacciones demoraban entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6 horas para la transcripción de las secuencias del templado de hasta 400 nucleótidos de longitud aproximadamente, y hasta 20 horas para la transcripción de secuencias de templado mayores que 400 nucleótidos de longitud aproximadamente El calentamiento de la reacción a 65 °C por quince minutos termina la transcripción del ARN Los productos de la transcripción del ARN se precipitaron en etanol, se lavaron, se secaron al aire y se volvieron a suspender en agua sin RNAsa hasta una concentración de 1 microgramo por microlitro aproximadamente. La mayoría de los transcriptos que aprovechaban de la estrategia de oposición con el promotor T7 descrito precedentemente produjeron ARN de cadena doble en la reacción de transcripción *in vitro*, sin embargo, se obtuvo un mayor rendimiento de ARN de cadena doble por calentamiento del ARN purificado a 65 °C y un enfriamiento lento posterior hasta temperatura ambiente para asegurar una alineación apropiada de los segmentos de ARN orientados en el sentido del marco de lectura y antisentido. A continuación, los productos de ARN de cadena doble fueron incubados con DNAsa I y RNAsa a 37 °C durante una hora para eliminar todo ADN o ARN de

cadena simple presente en la mezcla Los productos de ARN de cadena doble se purificaron en una columna de acuerdo con las instrucciones del proveedor (conjunto de elementos para ARNi AMBION MEGASCRIPT) y se volvieron a suspender en solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) o agua sin RNAsa hasta una concentración entre 0,1 y 1,0 microgramos por microlitro.

La muestra de ARN de cadena doble se agregó directamente a cada cavidad que contenía la dieta para insectos como se indicó previamente o bien, era modificada antes de su adición a la dieta La modificación del ARN de cadena doble se efectuó según las instrucciones para RNAsa III (AMBION CORPORATION, Austin, Texas) o DICER (STRATAGENE, La Jolla, California) provistas por el proveedor La digestión con RNAsa III del ARN de cadena doble produjo veintiún y veintidós duplas de nucleótidos que contenían extremos 5' fosforilados y extremos 3' hidroxilados con superposiciones de 2-3 bases, similares a los ~21-26 pares de bases de las duplas de fragmentos de ARN pequeño de interferencia (ARNsi) producidos por la enzima *dicer* en la vía de eucariotas identificada por Hamilton et al. (*Science*, 1999, 286: 950-952) y Elbashir et al. (*Genes & Development*, 2001, 15 188-200) Este conjunto de duplas de ARN pequeño de interferencia fueron purificadas adicionalmente y la muestra se caracterizó por electroforesis sobre gel de poliacrilamida para determinar la integridad y eficacia de formación de las duplas. Después se determinó la pureza y cantidad de las muestras por espectrometría a una longitud de onda de 250 nanometros y las muestras sin usar se retuvieron para su uso posterior guardándose a–20 °C.

Las muestras de ARNsi o ARN de cadena doble (ARNds) de longitud completa fueron sometidas a bioensayos con una cantidad seleccionada de plagas blanco. Se aplicaron dosis variables de ARNds o ARNsi sobre la dieta artificial del gusano de la raíz de maíz de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se obtuvieron huevos de *Diabrotica virgifera virgifera* (WCR) de

Crop Characteristics, Inc., Farmington, Minnesota. Los huevos de WCR que no se encontraban en la diapausia fueron incubados en tierra durante aproximadamente 13 días a 24 °C, 60% de humedad relativa, en oscuridad total. El día 13, la tierra que contenía los huevos WCR se colocaron entre mallas de mesh Nº 30 y Nº 60 y los huevos se lavaron de la tierra usando una manguera de jardín a gran presión. Se desinfestó la superficie de los huevos por remojo en LYSOL durante tres minutos, luego se lavaron tres veces con agua estéril, se lavaron una vez con una solución al 10% de formalina y luego se lavaron tres veces más con agua estéril Los huevos así tratados se dispusieron sobre filtros de café estériles y eclosionaron durante la noche a 27 °C, 60% de humedad relativa, en oscuridad total

Se preparó una dieta para insectos esencialmente de acuerdo con Pleau et al. (*Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2002, 105. 1-11), con las siguientes modificaciones Se dispusieron 9,4 gramos de agar SERVA en 540 mililitros de agua purificada y se agitó hasta lograr una distribución exhaustiva del agar La mezcla de agua/agar se calentó hasta ebullición para disolver el agar por completo y luego se vertió en un mezclador WARING El mezclador se mantuvo a baja velocidad mientras se agregaban 62,7 gramos de mezcla BIO-SERV DIET (F9757), 3,75 gramos de raíz de maíz liofilizado, 1,25 mililitros de colorante verde alimentario y 0,6 mililitros de formalina a la mezcla de agar caliente. Después se ajustó el pH de la mezcla en 9,0 con la adición de una solución madre al 10% de hidróxido de potasio. El volumen de aproximadamente 600 mililitros de dieta líquida se mezcló continuamente a gran velocidad y se mantuvo a una temperatura entre aproximadamente 48 °C y aproximadamente 60 °C usando una barra de agitación magnética recubierta con NALGENE esterilizada sobre una placa de agitación magnética caliente mientras se distribuían alícuotas de 200 microlitros en cada cavidad de FALCON placas para microtitulación de fondo redondeado de 96 cavidades Se

dejó que la dieta en las placas solidificara y se secara al aire bajo una campana de flujo laminar estéril durante aproximadamente diez minutos.

Se utilizaron volúmenes de treinta (30) microlitros de muestra de pruebas que contenían ya sea reactivos control o el ARN de cadena doble en cantidades variables para recubrir la superficie de la dieta para insectos en cada cavidad usando un micropipeteador automático La dieta para insectos se dejó en reposo bajo una campana de flujo laminar estéril hasta un máximo de media hora después de aplicar la muestra de prueba para dejar que los reactivos difundan por el dieta y para que se seque la superficie de la misma Se depositó una larva neonata de WCR en cada cavidad con un pincel fino A continuación se sellaron las placas con MYLAR y se ventilaron usando una varilla para insectos Se evaluaron 12-72 larvas de insecto por dosis dependiendo del diseño del ensayo Las placas de bioensayo fueron incubadas a 27 °C, 60% de humedad relativa en oscuridad total durante 12-14 días Se registró la cantidad de larvas que sobrevivieron por dosis a los 12-14 días La masa larval se determinó usando una microbalanza adecuada para cada larva que sobrevivió. Los datos se analizaron usando el software estadístico JMP©4 (SAS Institute, 1995) y se condujo un ANOVA factorial completo con la prueba de Dunnet para hallar los efectos del tratamiento en comparación con el control no tratado ($P<0,05$). Se efectuó asimismo una prueba de Tukey-Kramer *post hoc* para comparar todos los pares de los tratamientos ($P<0,05$)

Las siguientes secuencias de nucleótidos fueron derivadas primero como secuencias de ADNc identificadas en una biblioteca de ADNc de intestino del gusano de la raíz de maíz (Andersen et al., *ibid*) y luego fueron adaptadas para su uso en la construcción de moléculas de ARN de cadena doble destinadas a la evaluación de la eficacia de inhibición de la función biológica en una plaga por alimentación de moléculas de ARN de cadena doble en la dieta de dicha plaga

• Una secuencia homóloga de Chd3

Los genes CHD han sido identificados en numerosos eucariotas y se ha propuesto que las proteínas correspondientes funcionan como factores de remodelación de la cromatina El término CHD deriva de los tres dominios con homología de secuencia presentes en las proteínas CHD un dominio cromo (modificador de la organización de la cromatina), un dominio de helicasa/ATPasa relacionado con SNF2 y un dominio de unión a ADN. Se cree que cada uno de ellos confiere una actividad distinta relacionada con la cromatina. Las proteínas CHD están separadas en dos categorías basado en la presencia o ausencia de otro dominio con homología de secuencia, un dominio en dedo de zinc PHD, típicamente asociado con la actividad relacionada con la cromatina. Las proteínas relacionadas con CHD3 poseen un dominio en dedo de zinc PHD, pero no las proteínas relacionadas con CHD1 Las observaciones experimentales han sugerido un rol de las proteínas CHD3 en la represión de la transcripción, y se ha demostrado que en algunas especies son un componente de un complejo que contiene una histona desacetilasa como una subunidad. La desacetilación de las histonas se correlaciona con la inactivación de la transcripción, y por ello es que las proteínas CHD3 se han relacionado con una función como represores de la transcripción en virtud de ser componentes de un complejo de histona desacetilasa (Ogas et al , 1999, *PNAS* 96: 13839-13844) Por consiguiente, la supresión de la síntesis de proteínas CHD3 puede constituir un blanco de utilidad para una inhibición de plagas de invertebrados mediada por un ARN de cadena doble.

La SEQ ID N°· 4 corresponde a una secuencia de nucleótidos de ADNc de intestino de CRW, cuya traducción en la secuencia de aminoácidos se indicó como una secuencia de aminoácidos homóloga de CHD3 de *Drosophila melanogaster* (GenBank N° Acceso AF007780) Las SEQ ID N° 5 y SEQ ID N° 40609 corresponden respectivamente a los cebadores de amplificación

genómicos directo e inverso (es decir, un par de cebadores) para su uso en la producción de un amplicón del ADN genómico de CRW, de agrupaciones de ARNm de CRW o de un ADNc producido a partir de dichas agrupaciones La secuencia de dicho amplicón corresponde a una parte de un gen de CRW que codifica un homólogo de una secuencia de aminoácidos CHD3 de *D. melanogaster* La SEQ ID Nº· 5 contiene una secuencia promotora de la polimerasa T7 por su extremo 5' (nucleótidos 1-23) ligada a una secuencia de un cebador genómico de CRW (asignada arbitrariamente como la secuencia del cebador directo) que se muestra en la SEQ ID Nº 5 en las posiciones de nucleótidos 24-45, que corresponden de la posición de nucleótido 31 a la posición de nucleótido 52 como se muestra en la SEQ ID Nº 4 La SEQ ID Nº 6 contiene una secuencia promotora de la polimerasa T7 por su extremo 5' que se muestra en las posiciones de nucleótido 1-23. La secuencia promotora T7 está ligada por su extremo 3' a una secuencia de un cebador genómico inverso, asignado arbitrariamente, correspondiente a las posiciones de nucleótido 24-44 como se muestra en la SEQ ID Nº 6, cuyo complemento inverso se muestra en la SEQ ID Nº 4 en las posiciones de nucleótido 298-319 Con el uso de un par de cebadores que consistía de las SEQ ID Nº· 5 y SEQ ID Nº. 6 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como templado, se produjo un amplicón de 335 pares de bases que comprendía la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 7, correspondiente a la parte del genoma de CRW que codifica una proteína que exhibe aproximadamente un 66% de identidad con una secuencia de aminoácidos CHD3 de *Drosophila melanogaster*. Los nucleótidos en las posiciones 1-23 y el complemento inverso de los nucleótidos en las posiciones 314-335 que se muestra en la SEQ ID Nº. 7 corresponden a las secuencias promotoras T7 en cada extremo del amplicón La secuencia de nucleótidos genómica amplificada que se muestra en la SEQ ID Nº 7 desde el nucleótido 24 hasta el nucleótido 313 corresponde

sustancialmente a la secuencia de nucleótidos de ADNc informada que se muestra en la SEQ ID Nº: 4 desde el nucleótido 31 hasta el nucleótido 319, excepto que los nucleótidos en las posiciones 63, 87, 117, 177, 198, 213, 219-220, 246, 249 y 261 que se muestran en la SEQ ID Nº 4 fueron informados como T, T, G, G, G, T, T, T, C, C y A, respectivamente, en tanto las correspondientes posiciones en la alineación con la SEQ ID Nº 7 contenían C, C, A, A, A, C, A, C, G, A y G en las posiciones de nucleótidos 56, 80, 110, 170, 191, 206, 212-213, 239, 242 y 254 Esta diferencia corresponde aproximadamente a un 4% de diferencia en la composición de la secuencia de nucleótidos entre la secuencia de ADNc previamente informada y la secuencia del amplicón producido a partir del templado de ADN genómico, coherente con el informe anterior que la secuencia de ADNc probablemente era menos que un 99% precisa (Andersen et al., *ibid*)

El amplicón que exhibe la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº 7 se clonó en un vector plásmido capaz de replicarse en *E. coli* y se recuperó una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir una transcripción *in vitro* de la ARN polimerasa T7 a partir de los promotores T7 convergentes incluidos en ambos extremos del fragmento clonado Se produjo un ARN de cadena doble y fue sometido a bioensayos; un segmento de ARN, que consistía de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 7 desde la posición de nucleótido 24 aproximadamente hasta al menos la posición de nucleótido 313 aproximadamente excepto que hay un residuo uridina en cada posición donde aparece un residuo timidina, se muestra en la SEQ ID Nº· 7, el otro segmento de ARN es sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº. 7 desde la posición de nucleótido 313 aproximadamente hasta al menos la posición de nucleótido 24 aproximadamente, con uridinas ubicadas apropiadamente en el lugar de las timidinas Se trató una muestra de ARN de cadena doble (ARNds) con DICER

o con RNAsa III para producir una cantidad suficiente de ARN pequeños de interferencia (ARNsi) Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNsi o ARNds se dispusieron sobre la dieta para CRW del bioensayo como se describió precedentemente y se dejó que las larvas se alimentaran durante 13 días Las larvas de CRW que se alimentaban de la dieta que contiene el ARNds correspondiente a todo o una parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº. 4 exhibieron una inhibición del crecimiento y mortalidad significativos en comparación con los controles

También se evaluaron otras secuencias de nucleótidos derivadas del CRW en bioensayos paralelos con secuencias CHD3 incluyendo las secuencias de nucleótidos anotadas por codificar probablemente equivalentes de las proteínas CRW, tal como la proteína beta-tubulina, la proteína de la subunidad de V-ATPasa de 40 kDa, proteínas de los factores de elongación EF1α y EF1α 48D, proteína p28 de la subunidad 26S del proteosoma, la proteína epóxido hidrolasa de la hormona juvenil, la proteína del canal de cloro dependiente de hinchamiento, la proteína glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa, proteína actina 42A, proteína del factor 1 de ribosilación de ADP, el factor de transcripción IIB, proteínas quitinasa y una enzima de conjugación de ubiquitina

- Una secuencia homóloga de la beta-tubulina

Las proteínas tubulina son componentes estructurales importantes de muchas estructuras celulares en todas las células eucariotas y principalmente en la formación de los microtúbulos. La inhibición de la formación de microtúbulos en las células da como resultado efectos catastróficos que incluyen la interferencia en la formación del huso mitótico, el bloqueo de la división celular y semejantes Por ello, la supresión de la formación de la proteína tubulina puede constituir un blanco útil para una inhibición mediada por ARN de cadena doble

Se identificó una secuencia relacionada con la beta-tubulina derivada de CRW para su uso en la presente invención La SEQ ID Nº: 18 corresponde a una secuencia de nucleótidos de ADNc del intestino de CRW y se encontró que la traducción en la secuencia de aminoácidos correspondiente era homóloga en parte a la secuencia de aminoácidos de la beta-1-tubulina de *Manduca sexta* y en parte a la secuencia de aminoácidos de la beta-1-tubulina de *Drosophila melanogaster* (GenBank Nº Acceso AF030547 y M20419, respectivamente). Las SEQ ID Nº 19 y SEQ ID Nº 20 corresponden, respectivamente, a cebadores de amplificación genómicos directo e inverso(es decir, un par de cebadores) para su uso en la producción de un amplicón a partir de ADN genómico de CRW, a partir de agrupaciones de ARNm de CRW o a partir de un ADNc producido a partir de dichas agrupaciones La secuencia de dicho amplicón corresponde a todo o parte de un gen de CRW que codifica una proteína beta-tubulina Las SEQ ID Nº: 19 y SEQ ID Nº 20 contienen, cada una, una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos en las posiciones de nucleótido 1-23, respectivamente Los nucleótidos 24-44 que se muestran en la SEQ ID Nº. 19 corresponden a los nucleótidos 96-116 de la SEQ ID Nº. 18 Los nucleótidos 24-44 que se muestran en la SEQ ID Nº: 20 corresponden al complemento inverso de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº: 18 en los nucleótidos 428-448 El uso del par de cebadores de las SEQ ID Nº: 19 y SEQ ID Nº 20 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como templado, permitió producir un amplicón de 399 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 21, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma del CRW que codifica una proteína que presenta una identidad sustancial con una proteína beta-tubulina homóloga presente en *Drosophila melanogaster* y *Manduca sexta* La secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 21 corresponde sustancialmente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID Nº· 18 de los

nucleótidos 96-448. No se observaron diferencias de secuencia entre la secuencia del amplicón genómico y la correspondiente secuencia en la secuencia de ADNc

Se clonó un amplicón que presenta una secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº 21 en un vector plásmido, y se recuperó una cantidad suficiente de plásmido ADN como para efectuar una transcripción in vitro con la ARN polimerasa T7 a partir de los promotores T7 convergentes incluidos en cualquiera de los extremos del amplicón clonado Se obtuvo el ARN de cadena doble y una muestra del mismo fue sometida a un bioensayo, un segmento de ARN, la cadena orientada en el sentido del marco de lectura, que consistía de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 21 desde la posición de nucleótido 24 aproximadamente al menos hasta la posición de nucleótido 376 aproximadamente, excepto que hay un residuo uridina en cada posición en la cual aparece un residuo timidina en la SEQ ID Nº: 21, el complemento inverso del segmento de ARN o la cadena antisentido, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº: 21 desde la posición de nucleótido 376 aproximadamente hasta al menos la posición de nucleótido 24 aproximadamente, con uridinas ubicadas apropiadamente en lugar de timidinas Se trató una muestra de ARN de cadena doble (ARNds) con DICER o con RNAsa III para producir una cantidad suficiente de ARN pequeños de interferencia (ARNsi). Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNsi o ARNds se dispusieron sobre la dieta del bioensayo para CRW como se describió precedentemente y se dejó que las larvas se alimentaran durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaban de la dieta que contenía el ARNds correspondiente a todo o una parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº: 18 exhibieron una inhibición del crecimiento y mortalidad significativos en comparación con los controles.

• Una secuencia homóloga de V-ATPasa de 40 kDa

El metabolismo energético dentro de los organelas subcelulares en los sistemas eucariotas es una función esencial Las sintetasas de ATP vacuolares están comprometidas en el mantenimiento de niveles suficientes de ATP dentro de las vacuolas Por ello, las sintetasas de ATP vacuolares pueden ser blancos útiles para una inhibición mediada por ARN de cadena doble

La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína que presentó similitud con la V-ATPasa de 40 kDa derivaba del CRW. La secuencia de aminoácidos traducida de la SEQ ID Nº 32 presentó homología con una secuencia de aminoácidos de la subunidad de V-ATPasa de 40 kDa de *Manduca sexta* (GenBank Nº Acceso X98825) Las SEQ ID Nº: 33 y SEQ ID Nº 34 corresponden, respectivamente, a los cebadores de amplificación genómicos directo e inverso (es decir, un par de cebadores) para su uso en la producción de un amplicón a partir de ADN genómico de CRW, agrupaciones de ARNm de CRW o un ADNc derivado de dichas agrupaciones de CRW La secuencia de dicho amplicón debería corresponder a todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de la V-ATPasa de 40 kDa Sin embargo, la secuencia de nucleótidos del amplicón derivado, usando ADN genómico de CRW como templado, era incoherente con la secuencia informada de ADNc que se muestra en la SEQ ID Nº: 32

Las SEQ ID Nº 33 y SEQ ID Nº 34 representan cebadores de amplificación térmica. Cada cebador contiene una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos en las posiciones de nucleótido 1-23 respectivamente Los nucleótidos 24-40 que se muestran en la SEQ ID Nº: 33 corresponden a los nucleótidos 95-111 de la SEQ ID Nº 32 Los nucleótidos 24-43 que se muestran en la SEQ ID Nº. 34 corresponden al complemento inverso de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 32 en los nucleótidos 362-381 El uso del par de cebadores que consistían de las SEQ ID Nº: 33 y SEQ ID Nº: 34

en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como templado, permitió producir un amplicón de 291 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 35 La SEQ ID Nº 35, desde el nucleótido 24 hasta el nucleótido 268, solamente presentaba un 50% de homología aproximadamente con la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 32 basado en la alineación de ADN de Martínez/Needleman-Wunsch. La secuencia del amplicón derivada con el par de cebadores de amplificación térmica era incoherente con la secuencia informada que se muestra en la SEQ ID Nº 32 Preferentemente, se produce un amplicón usando una agrupación de ARNm de CRW o un ADNc derivado de dicha agrupación

Se produjo un amplicón que presentaba la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº: 32 entre la posición de nucleótido 95 aproximadamente y la posición de nucleótido 381 aproximadamente, se clonó en un vector plásmido, y se recuperó una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir la transcripción *in vitro* con la ARN polimerasa T7 a partir de los promotores T7 convergentes incluidos en cualquiera de los extremos del amplicón clonado. Se produjo ARN de cadena doble y una muestra del mismo fue sometido a un bioensayo; un segmento de ARN, orientado en el sentido del marco de lectura, que consistía de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 32 entre la posición de nucleótido 95 aproximadamente y al menos la posición de nucleótido 381 aproximadamente, excepto que había un residuo uridina en cada posición en la que aparece un residuo de timidina en la SEQ ID Nº: 32, y un segmento de ARN del complemento inverso, o la cadena antisentido, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 32 entre la posición de nucleótido 381 aproximadamente y al menos la posición de nucleótido 95 aproximadamente, con uridinas ubicadas apropiadamente en lugar de timidinas Se trató una

muestra de ARN de cadena doble (ARNds) con DICER o con RNAsa III para producir una cantidad suficiente de ARN pequeños de interferencia (ARNsi). Se dispusieron muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNsi o ARNds sobre la dieta para CRW del bioensayo como se describió precedentemente y se dejó que las larvas se alimentaran durante 13 días Las larvas de CRW que se alimentaban de la dieta que contenía ARNds correspondiente a todo o una parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 32 presentaron una inhibición del crecimiento y mortalidad significativos en comparación con los controles

- Una secuencia homóloga de EF1α

Los factores de elongación de la transcripción y de terminación de la transcripción son esenciales para el metabolismo y pueden constituir blancos ventajosos para una inhibición mediada por ARN de cadena doble

Se identificaron al menos dos secuencias de ADNc de CRW para su uso en la presente invención, que supuestamente codifican homólogos del factor de elongación 1 alfa (EF1α)

La traducción en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de ADNc *singleton* de CRW que se muestra en la SEQ ID Nº 36 presentaba homología con una secuencia de aminoácidos de EF-1-alfa de *Drosophila melanogaster* (GenBank Nº Acceso X06870). También se identificaron otras secuencias que codificarían proteínas homólogas de EF1α de la biblioteca de ADNc de intestino de CRW Estas secuencias se alinearon para producir la secuencia UNIGENE que se muestra en la SEQ ID Nº: 40, que supuestamente codifica una proteína homóloga de EF1α denominada 48D en la presente Varias de las secuencias comprendidas en este *singleton* codificarían secuencias de aminoácidos que presentan homología con diversas secuencias de proteínas homólogas de EF1α incluyendo, en un sentido no limitativo, una EF1α de *Bombyx mori* (GenBank Nº Acceso D13338), una EF1α de la especie

Artemia (GenBank Nº Acceso X03704), una EF1α de *Spragueia leo* (GenBank Nº Acceso U85680), una EF1α de *Apis mellifera* (GenBank Nº Acceso AF015267), una EF1α de *Anisakis simplex* (GenBank Nº Acceso AJ250539), una EF1α de *Papaipema* especie (GenBank Nº Acceso AF151628), una EF1α de *Ephedrus persicae* (GenBank Nº Acceso Z83663), una EF1α de *Papilio garamas* (GenBank Nº Acceso AF044833), una EF1α de *Alysia lucicola* (GenBank Nº Acceso Z83667), una EF1α de la especie *Bracon* (GenBank Nº Acceso Z83669), una EF1α de *Histeromerus mystacinus* (GenBank Nº Acceso Z83666) y una EF1α de *Caenorhabditis elegans* (GenBank Nº Acceso U41534).

Una secuencia de ADNc de CRW que codificaría una parte de un homólogo de EF1α se denomina secuencia B2 en la presente y se muestra en la SEQ ID Nº 36. Las SEQ ID Nº 37 y SEQ ID Nº 38 corresponden respectivamente a los cebadores de amplificación genómicos directo e inverso (es decir, un par de cebadores, con referencia a las correspondientes secuencias del complemento inverso que se muestran en la SEQ ID Nº 36) para su uso en la producción de un amplicón a partir de ADN genómico de CRW, agrupaciones de ARNm de CRW o a partir de un ADNc derivado de dichas agrupaciones de ARNm La secuencia de dicho amplicón debería corresponder a todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de EF1α Sin embargo, la secuencia de nucleótidos del amplicón derivado cuando se usó ADN genómico de CRW como templado era incoherente con la secuencia informada de ADNc que se muestra en la SEQ ID Nº 36

Las SEQ ID Nº: 37 y SEQ ID Nº. 38 representan secuencias de cebadores de amplificación térmica Cada cebador contiene una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos desde las posiciones de nucleótido 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-44 que se muestran en la SEQ ID Nº 37 corresponden a los nucleótidos 8-29 de la SEQ ID Nº 36 Los nucleótidos 24-

42 que se muestran en la SEQ ID Nº 38 corresponden al complemento inverso de la secuencia de la SEQ ID Nº 36 en los nucleótidos 310-328 Usando el par de cebadores que consistía de la SEQ ID Nº 37 y la SEQ ID Nº. 38 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como templado, se obtuvo un amplicón de 933 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 39 La secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 39 era incoherente con la secuencia de nucleótidos desde la posición de nucleótido 8 hasta la posición de nucleótido 328 en la SEQ ID Nº: 36 Preferentemente, el amplicón se produce usando una agrupación de ARNm de CRW o un ADNc derivado de dicha agrupación, tal como por ejemplo, la SEQ ID Nº 36

Se obtuvo un amplicón que presentaba la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº 36 desde la posición de nucleótido 8 aproximadamente hasta la posición de nucleótido 328 aproximadamente usando agrupaciones de ARNm de CRW o ADNc preparado a partir de dichas agrupaciones, y se clonó en un vector plásmido. Se recuperó una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir la transcripción in vitro con la ARN polimerasa T7 a partir de los promotores T7 convergentes incluidos en cualquiera de los extremos del amplicón clonado. Se obtuvo el ARN de cadena doble y una muestra del mismo fue sometida a un bioensayo, un segmento de ARN, la cadena orientada en el sentido del marco de lectura, que consistía de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº· 36 entre la posición de nucleótido 8 aproximadamente y al menos la posición de nucleótido 328 aproximadamente excepto que hay un residuo uridina en cada posición donde aparece un residuo timidina en la SEQ ID Nº 36, y el segmento de ARN del complemento inverso, o la cadena antisentido, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº· 36 entre la posición de nucleótido 328 aproximadamente y al menos la posición de nucleótido 8

aproximadamente, con uridinas ubicadas apropiadamente en lugar de timidinas. La muestra de ARN de cadena doble (ARNds) se trató con DICER o con RNAsa III para producir una cantidad suficiente de ARN pequeños de interferencia (ARNsi) Se distribuyeron muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNsi o ARNds sobre la dieta de bioensayo de CRW como se describió precedentemente y se dejó que las larvas se alimentaran durante 13 días Las larvas de CRW que se alimentaban de la dieta que contenía el ARNds correspondiente a todo o una parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº: 36 presentaban una inhibición del crecimiento y mortalidad significativos en comparación con los controles

La secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 40 se usó para diseñar un par de cebadores para su uso en la amplificación de una secuencia de ADN genómico de CRW que codifica la secuencia de la proteína homóloga de EF1α 48D. Las SEQ ID Nº. 41 y SEQ ID Nº. 42 corresponden respectivamente a los cebadores de amplificación genómicos directo e inverso (es decir, un par de cebadores). Las SEQ ID Nº 41 y SEQ ID Nº 42 contienen, cada una, una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos desde las posiciones de nucleótido 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-41 que se muestran en la SEQ ID Nº. 41 corresponden a los nucleótidos 61-79 de la SEQ ID Nº 40. Los nucleótidos 24-45 que se muestran en la SEQ ID Nº 42 corresponden al complemento inverso de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº. 40 en los nucleótidos 562-583. El uso del par de cebadores que consistía de la SEQ ID Nº: 41 y la SEQ ID Nº 42 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como templado, permitió obtener un amplicón de 569 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº. 43, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma de CRW que codifica la proteína que exhibe identidad sustancial con la proteína EF1α también presente en *Drosophila melanogaster*. La secuencia de nucleótidos que se

muestra en la SEQ ID Nº: 43 desde el nucleótido 24 aproximadamente hasta el nucleótido 546 aproximadamente corresponde sustancialmente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID Nº 40 en los nucleótidos 61-583 aproximadamente. No se observaron diferencias de secuencia entre la secuencia genómica del amplicón y la correspondiente secuencia en la secuencia de ADNc.

El amplicón que presenta la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº 43 se clonó en un vector plásmido, y se recuperó una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir la transcripción in vitro con la ARN polimerasa T7 a partir de los promotores T7 convergentes incluidos en cualquiera de los extremos del amplicón clonado Se obtuvo el ARN de cadena doble y una muestra del mismo fue sometida a un bioensayo; un segmento del ARN, orientado en el sentido del marco de lectura, que consistía de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº: 43 entre la posición de nucleótido 24 aproximadamente y al menos la posición de nucleótido 546 aproximadamente excepto que había un residuo uridina en cada posición donde aparecía un residuo timidina, se muestra en la SEQ ID Nº 43, y el segmento de ARN del complemento inverso, o la cadena antisentido, era sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 43 desde la posición de nucleótido 546 aproximadamente y al menos la posición de nucleótido 24 aproximadamente, con las uridinas ubicadas apropiadamente en lugar de timidinas. Una muestra del ARN de cadena doble (ARNds) se trató con DICER o con RNAsa III para producir una cantidad suficiente de ARN pequeños de interferencia (ARNsi) Se dispusieron muestras que contenían 0,15 partes por millón de ARNsi o ARNds sobre la dieta de CRW del bioensayo como se describió precedentemente y se dejó que las larvas se alimentaran durante 13 días. Las larvas CRW que se alimentaban de la dieta que contenía el ARNds correspondiente a todo o una

parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº: 43 presentaron una inhibición del crecimiento y mortalidad significativos en comparación con los controles.

• Una secuencia homóloga de la subunidad p28 del proteosoma 26S

El proteasoma 26S es una proteasa grande, dependiente de ATP, de múltiples subunidades, altamente conservada en todos los eucariotas Cumple una función general en la eliminación selectiva de varias proteínas de vida corta que se ligan primero de forma covalente a ubiquitina y luego son degradadas por el complejo del proteasoma 26S. La vía de la ubiquitina cumple un rol importante en el control del ciclo celular por la degradación específica de numerosas de proteínas reguladoras, incluyendo ciclinas mitóticas e inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas tal como la p27 de células de mamífero Por consiguiente, la supresión de la síntesis del proteasoma 26S y la supresión de la síntesis de las subunidades que lo componen pueden constituir blancos preferidos para una inhibición mediada por ARN de cadena doble (Smith et al , Plant Phys. 1997, 113. 281-291).

Se identificó una secuencia de ADNc derivada de una biblioteca de intestino de CRW como parcialmente homóloga de la secuencia de aminoácidos de la subunidad del proteosoma 26S y se usó en la presente invención La SEQ ID Nº· 44 corresponde sustancialmente a la secuencia de nucleótidos de ADNc de intestino de CRW. La traducción en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº. 44 presentó homología con la proteína de la subunidad p28 del proteasoma 26S (GenBank Nº Acceso AB009619) Las SEQ ID Nº 45 y SEQ ID Nº 46 corresponden respectivamente a los cebadores de amplificación genómicos directo e inverso (es decir, un par de cebadores) para su uso en la producción de un amplicón a partir de ADN genómico de CRW, a partir de agrupaciones de ARNm de CRW y a partir del ADNc producido a partir de dichas agrupaciones. Un amplicón producido de esta manera debería tener

una secuencia que codifica todo o una parte de un gen de CRW que codifica un homólogo de la proteína de la subunidad del proteosoma 26S Las SEQ ID Nº 45 y SEQ ID Nº: 46 contienen, cada una, una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos en las posiciones de nucleótido 1-23 respectivamente Los nucleótidos 24-46 que se muestran en la SEQ ID Nº. 45 corresponden a los nucleótidos 130-152 de la SEQ ID Nº 34 Los nucleótidos 24-41 que se muestran en la SEQ ID Nº: 46 corresponden al complemento inverso de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº. 44 en los nucleótidos 423-440 El uso del par de cebadores que consistía de las SEQ ID Nº. 44 y SEQ ID Nº 46 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como templado, permitió obtener un amplicón de 1113 pares de bases que comprendía la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 47 La secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 47 no correspondía a la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 44 y por ello era incoherente con la secuencia informada de ADNc de la SEQ ID Nº: 44 Se prefiere producir un amplicón usando una agrupación de ARNm de CRW o un ADNc derivado de dicha agrupación.

Se obtuvo un amplicón con una secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº 44 desde el nucleótido 130 aproximadamente hasta el nucleótido 440 aproximadamente, se clonó en un vector plásmido y se recuperó una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir la transcripción in vitro con la ARN polimerasa T7 a partir de los promotores T7 convergentes incluidos en cualquiera de los extremos del amplicón clonado Se produjo el ARN de cadena doble y una muestra del mismo fue sometido a un bioensayo; un segmento de ARN, la cadena orientada en el sentido del marco de lectura, que consistía de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 44 desde la posición de nucleótido 130 aproximadamente hasta al menos la posición de nucleótido 440 aproximadamente excepto que hay un residuo uridina en cada posición donde

aparece un residuo timidina en la SEQ ID Nº 44, y el segmento de ARN del complemento inverso, o la cadena antisentido, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº· 44 entre la posición de nucleótido 440 aproximadamente y al menos la posición de nucleótido 110 aproximadamente, con uridinas ubicadas apropiadamente en lugar de timidinas Una muestra del ARN de cadena doble (ARNds) se trató con DICER o con RNAsa III para producir una cantidad suficiente de ARN pequeños de interferencia (ARNsi) Se dispusieron muestras que contenían 0,15 partes por millón de ARNsi o ARNds sobre la Dieta para CRW del bioensayo como se describió precedentemente y se dejó que las larvas se alimentaran durante 13 días Las larvas de CRW que se alimentaban de la dieta que contenía el ARNds correspondiente a todo o una parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº· 44 presentaba una inhibición del crecimiento y mortalidad significativos en comparación con los controles

• Una secuencia homóloga de la epóxido hidrolasa de la hormona juvenil

La hormona juvenil de insectos controla y regula una variedad de procesos biológicos necesarios dentro del ciclo de vida de insectos incluyendo, aunque no necesariamente limitados a los mismos, metamorfosis, reproducción y diapausia Las concentraciones pico de hormona juvenil (JH) son necesarias, en el momento apropiado, en la hemolinfa de la forma larvaria de una plaga de insectos, en particular las larvas de lepidópteros y coleópteros, y luego deben ser degradadas con el fin de terminar los efectos de la respuesta hormonal Las enzimas comprometidas en la disminución de la concentración de la hormona juvenil son eficaces a través de dos vías primarias de la degradación metabólica Una vía comprende una esterasa de la hormona juvenil (JHE), que hidroliza el metil éster proporcionando el ácido correspondiente La segunda vía utiliza la epóxido hidrolasa de la hormona juvenil (JHEH) para lograr la

hidrólisis del epóxido, dando como resultado la formación del diol La contribución de JHE en la degradación de JH está bien dilucidada y se ha encontrado que no varía entre las especies de lepidópteros y coleópteros La inhibición de la esterasa de la JH se ha asociado con cambios morfológicos severos incluyendo, en un sentido no limitativo, deambulación larvaria, pupación diferida y desarrollo de malformaciones intermedias Por el contrario, la contribución de la JHEH en el metabolismo JH está menos comprendida y se ha demostrado que varía entre especies, aunque estudios recientes apuntan a sugieren que la JHEH puede ser la ruta primaria del metabolismo de la JH (Brandon J Fetterolf, Tesis de Doctorado, Universidad del Estado de Carolina del Norte (10 de febrero, 2002) *Synthesis and Analysis of Mechanism Based Inhibitors of Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase from Insect Trichoplusia ni*) En cualquier caso, la interrupción de la degradación de cualquiera las vías de la JH usando tecnología de supresión de genes podría constituir un blanco eficaz para una inhibición de las plagas mediada por ARN de cadena doble. .

Se identificó secuencia homóloga derivada de CRW de una epóxido hidrolasa de la hormona juvenil de insectos para su uso en la presente invención. La SEQ ID Nº: 48 corresponde sustancialmente a una secuencia de nucleótidos de ADNc de intestino de CRW La traducción en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº. 48 presupone homología con una epóxido hidrolasa de la hormona juvenil (JHEH) en *Manduca Sexta* (GenBank Nº Acceso U46682). Las SEQ ID Nº. 49 y SEQ ID Nº. 50 corresponden respectivamente a los cebadores de amplificación directo e inverso (es decir, un par de cebadores) para su uso en la producción de un amplicón a partir de ADN genómico de CRW, agrupaciones de ARNm de CRW o un ADNc derivado de dichas agrupaciones de CRW. La secuencia de dicho amplicón debería corresponder a todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de JHEH Las SEQ ID Nº· 49 y SEQ ID Nº· 50 contienen, cada una,

una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos en las posiciones de nucleótido 1-23 respectivamente Los nucleótidos 24-42 que se muestran en la SEQ ID Nº 49 corresponden a los nucleótidos 7-26 de la SEQ ID Nº: 48. Los nucleótidos 24-44 que se muestran en la SEQ ID Nº 50 corresponden al complemento inverso de la secuencia de la SEQ ID Nº· 48 en los nucleótidos 360-380. El uso del par de cebadores que consistía de las SEQ ID Nº· 49 y SEQ ID Nº 50 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como templado, permitió obtener un amplicón de 95 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº. 52 La secuencia del amplicón no correspondía a la secuencia de ADNc que se muestra en la SEQ ID Nº: 48. Preferentemente, se obtiene un amplicón usando una agrupación de ARNm de CRW o un ADNc derivado de dicha agrupación como secuencia de nucleótidos templado en la reacción de amplificación.

El amplicón que presenta la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº 48 se clona en un vector plásmido, y se recupera una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir la transcripción in vitro con la ARN polimerasa T7 a partir de los promotores T7 convergentes incluidos en cualquiera de los extremos del amplicón clonado Se obtiene el ARN de cadena doble y una muestra del mismo es sometido a un bioensayo, un segmento del ARN, la cadena orientada en el sentido del marco de lectura, que consistía de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº: 48 desde la posición de nucleótido 7 aproximadamente y al menos la posición de nucleótido 380 aproximadamente excepto que hay un residuo uridina en cada posición donde aparece un residuo timidina, se muestra en la SEQ ID Nº 48, y el segmento de ARN del complemento inverso, o la cadena antisentido, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº· 48 desde la posición de nucleótido 380 aproximadamente hasta al menos la posición de nucleótido 7 aproximadamente, con las uridinas ubicadas

apropiadamente en lugar de timidinas Se trata una muestra del ARN de cadena doble (ARNds) se trata con DICER o con RNAsa III para producir una cantidad suficiente de ARN pequeños de interferencia (ARNsi) Se disponen muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNsi o ARNds sobre la dieta para CRW del bioensayo como se describió precedentemente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días Las larvas de CRW que se alimentaban de la dieta que contiene el ARNds correspondiente a todo o una parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº· 48 exhiben una inhibición del crecimiento y mortalidad significativos en comparación con los controles.

• Una secuencia homóloga de la proteína del canal de cloro dependiente de hinchamiento

Se ha propuesto que las proteínas del canal de cloro dependientes de hinchamiento cumplen un rol crítico en la regulación osmótica en los sistemas de células animales eucariotas Por ello, una secuencia de nucleótidos con capacidad para expresar una secuencia de aminoácidos que presentaba homología con las proteínas del canal de cloro dependientes de hinchamiento identificadas previamente puede ser de utilidad como blanco para una inhibición por ARN en una plaga

Se dedujo una secuencia de aminoácidos homóloga del canal de cloro dependiente de hinchamiento (SDCC) a partir de una biblioteca de ADNc de CRW y se usó en la presente invención La SEQ ID Nº 53 corresponde sustancialmente a una secuencia de nucleótidos de ADNc de intestino de CRW Se determinó que la traducción en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº· 53 era homóloga de una proteína SDCC en el pez cebra *Danio rerio* (GenBank Nº Acceso Y08484) Las SEQ ID Nº. 54 y SEQ ID Nº 55SEQ ID Nº 55 corresponden respectivamente a los cebadores de amplificación térmica directo e inverso (es decir, un par de cebadores) para su uso en la

producción de un amplicón a partir de ADN genómico de CRW, a partir de agrupaciones de ARNm de CRW o a partir de un ADNc derivado de dichas agrupaciones La secuencia de dicho amplicón debería corresponder a todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de SDCC Las SEQ ID Nº. 54 y SEQ ID Nº. 55 contienen, cada una, una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos desde las posiciones de nucleótido 1-23 respectivamente Los nucleótidos 24-43 que se muestran en la SEQ ID Nº 54 corresponden a los nucleótidos 78-97 de la SEQ ID Nº· 53 Los nucleótidos 24-41 que se muestran en la SEQ ID Nº 55 corresponden al complemento inverso de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº: 53 en los nucleótidos 332-349 El uso del par de cebadores que consistía de la SEQ ID Nº· 54 y la SEQ ID Nº 55 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como templado, permitió obtener un amplicón de 318 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 56, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma CRW que codifica una proteína que exhibe una identidad sustancial con una proteína SDCC La secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 56 desde el nucleótido 24 aproximadamente hasta el nucleótido 295 aproximadamente corresponde sustancialmente a la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 53 en los nucleótidos 78-349

El amplicón que presenta una secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº 56 se clona en un vector plásmido, y se recupera una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir la transcripción in vitro con la ARN polimerasa T7 a partir de los promotores T7 convergentes incluidos en cualquiera de los extremos del amplicón clonado. Se obtiene el ARN de cadena doble y una muestra del mismo es sometido a un bioensayo, un segmento de ARN, la cadena orientada en el sentido del marco de lectura, que consistía de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº. 56 desde la posición de

nucleótido 24 aproximadamente hasta al menos la posición de nucleótido 295 aproximadamente excepto que hay un residuo uridina en cada posición donde aparece un residuo timidina en la SEQ ID Nº. 56, y el segmento de ARN del complemento inverso, o la cadena antisentido, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº· 56 desde la posición de nucleótido 295 aproximadamente hasta al menos la posición de nucleótido 24 aproximadamente, con las uridinas ubicadas apropiadamente en lugar de las timidinas Se trata una muestra de ARN de cadena doble (ARNds) con DICER o con RNAsa III para producir una cantidad suficiente de ARN pequeños de interferencia (ARNsi) Se disponen muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNsi o ARNds sobre la dieta para CRW del bioensayo como se describió precedentemente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaban de la dieta que contiene el ARNds correspondiente a todo o una parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 56 presentan una inhibición del crecimiento y mortalidad significativos en comparación con los controles

• Una secuencia homóloga de la proteína glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa

La proteína glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa (G6PD) cataliza la oxidación de glucosa-6-fosfato en 6-fosfogluconato reduciendo concomitantemente la forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP+) en NADPH El NADPH es conocido en el arte como un cofactor necesario en muchas reacciones de biosíntesis en eucariotas y es conocido por mantener al glutatión en su forma reducida El glutatión reducido actúa como un agente secuestrante de los metabolitos oxidativos nocivos en células eucariotas, y con la asistencia de la enzima glutatión peroxidasa, convierte al peróxido de hidrógeno nocivo en agua (Beutler et al , 1991, *N*

Engl. J. Med 324 169-174) Por ello, la G6PD puede constituir un blanco preferido para una inhibición mediada por ARN de cadena doble de una plaga de invertebrados

Se dedujo una secuencia de aminoácidos homóloga de la proteína glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa (G6PD) de una biblioteca de ADNc de CRW y se usó en la presente invención La SEQ ID Nº 57 corresponde sustancialmente a una secuencia de nucleótidos de ADNc de intestino de CRW Se determinó que la traducción en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº. 57 exhibe homología con una proteína G6PD en una especie de pez actinopterigio (GenBank Nº Acceso U72484) Las SEQ ID Nº 58 y SEQ ID Nº· 59 corresponden, respectivamente, a los cebadores de amplificación genómicos directo e inverso (es decir, un par de cebadores) para su uso en la producción de un amplicón a partir de ADN genómico de CRW, a partir de agrupaciones de ARNm de CRW o a partir de un ADNc derivado de dichas agrupaciones La secuencia de dicho amplicón correspondería supuestamente a todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de G6PD Las SEQ ID Nº 58 y SEQ ID Nº 59 contienen, cada una, una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos desde las posiciones de nucleótido 1-23 respectivamente Los nucleótidos 24-46 que se muestran en la SEQ ID Nº. 58 corresponden a los nucleótidos 113-136 de la SEQ ID Nº 57. Los nucleótidos 24-45 que se muestran en la SEQ ID Nº: 59 corresponden al complemento inverso de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº· 57 en los nucleótidos 373-394 El uso del par de cebadores que consistía de la SEQ ID Nº 58 y la SEQ ID Nº 59 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como templado, permitió obtener un amplicón de 328 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 60, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta homología con una proteína G6PD. La secuencia de

nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 60 desde el nucleótido 24 aproximadamente hasta el nucleótido 305 aproximadamente corresponde sustancialmente a la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº: 57 en los nucleótidos 113-394.

Se clonó un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº 60 en un vector plásmido, y se recupera una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir la transcripción in vitro con la ARN polimerasa T7 a partir de los promotores T7 convergentes incluidos en cualquiera de los extremos del amplicón clonado. Se obtiene un ARN de cadena doble y una muestra del mismo es sometida a un bioensayo; un segmento de ARN, la cadena orientada en el sentido del marco de lectura, que consistía de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 60 desde la posición de nucleótido 24 aproximadamente hasta al menos la posición de nucleótido 305 aproximadamente excepto que hay un residuo uridina en cada posición donde aparece un residuo timidina, se muestra en la SEQ ID Nº: 60, y el segmento de ARN del complemento inverso, o la cadena antisentido, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 60 desde la posición de nucleótido 305 aproximadamente hasta al menos la posición de nucleótido 24 aproximadamente, con las uridinas ubicadas apropiadamente en lugar de timidinas. Se trató una muestra de ARN de cadena doble (ARNds) con DICER o con RNAsa III para producir una cantidad suficiente de ARN pequeños de interferencia (ARNsi). Se disponen muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNsi o ARNds sobre la dieta para CRW del bioensayo como se describió precedentemente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaban de la dieta que contiene ARNds correspondiente a todo o una parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 60 presentan una inhibición del crecimiento y mortalidad significativos en

comparación con los controles

- Una secuencia homóloga de la proteína Act42A

La actina es proteína ubicua y altamente conservada en eucariotas necesaria para la motilidad y el movimiento de las células (Lovato et al., 2001, *Insect Mol Biol* 20: 333-340) Se identificaron numerosas secuencias de ADNc de CRW que probablemente codifican actina o proteínas que presentan una estructura de secuencia de aminoácidos relacionada con las proteínas actina. Por ello, los genes que codifican homólogos de actina en las células de una plaga pueden constituir blancos útiles para una inhibición mediada por ARN de cadena doble.

Un grupo UNIGENE identificado en una biblioteca de ADNc de intestino del gusano de la raíz de maíz (Grupo 156_1) consistía de varias secuencias EST *singleton* cada una de las cuales codificaría supuestamente todo o una parte de proteínas homólogas de actina La alineación de estos *singletons* en el grupo, permitió derivar la secuencia consenso que se muestra en la SEQ ID Nº 61 que codificaría una proteína homóloga de actina Las secuencias de proteínas homólogas de actina en el grupo anotado incluyeron, a modo de ejemplo, fragmentos de actina 3 de *Drosophila melanogaster*, una actina A3a de citoplasma de *Helicoverpa armigera* (GenBank Nº Acceso X97614), una actina de *Drosophila melanogaster* (GenBank Nº Acceso X06383), una secuencia del ARN mensajero de una actina del hemicordado *Saccoglossus kowalevskii* y una actina de *Strongylocentrotus purpuratus* (GenBank Nº Acceso X05739).

Las SEQ ID Nº: 62 y SEQ ID Nº 63 corresponden, respectivamente, a los cebadores de amplificación genómicos directo e inverso (es decir, un par de cebadores) para su uso en la producción de un amplicón a partir de ADN genómico de CRW, agrupaciones de ARNm de CRW o a partir de un ADNc derivado de dichas agrupaciones La secuencia de dicho amplicón debería

corresponder a todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de actina. Las SEQ ID Nº· 62 y SEQ ID Nº: 63 contienen, cada una, una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos en las posiciones de nucleótido 1-23 respectivamente Los nucleótidos 24-45 que se muestran en la SEQ ID Nº: 62 corresponden a los nucleótidos 14-35 de la SEQ ID Nº 61 Los nucleótidos 24-45 que se muestran en la SEQ ID Nº 63 corresponden al complemento inverso de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 61 en los nucleótidos 449-470 El uso del par de cebadores que consistía de la SEQ ID Nº. 62 y la SEQ ID Nº: 63 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como templado, permitió obtener un amplicón de 503 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 64, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta homología con una proteína actina. La secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 64 desde el nucleótido 24 aproximadamente hasta el nucleótido 480 aproximadamente corresponde sustancialmente a la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº 61 en los nucleótidos 14-470

Se clonó un amplicón que presentaba la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº. 64 en un vector plásmido y se recuperó una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir la transcripción in vitro con la ARN polimerasa T7 a partir de los promotores T7 convergentes incluidos en cualquiera de los extremos del amplicón clonado Se obtuvo un ARN de cadena doble y una muestra del mismo fue sometida a un bioensayo, un segmento de ARN, la cadena orientada en el sentido del marco de lectura, que consistía de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº. 64 desde la posición de nucleótido 24 aproximadamente hasta al menos la posición de nucleótido 480 aproximadamente excepto que hay un residuo uridina en cada posición donde aparece un residuo timidina en la SEQ ID Nº· 64, y el segmento de ARN del

complemento inverso, o la cadena antisentido, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID Nº: 64 desde la posición de nucleótido 480 aproximadamente hasta al menos la posición de nucleótido 24 aproximadamente, con las uridinas ubicadas apropiadamente en el lugar de las timidinas Se trató una muestra del ARN de cadena doble (ARNds) con DICER o con RNAsa III para producir una cantidad suficiente de ARN pequeños de interferencia (ARNsi) Se disponen muestras que contienen 0,15 partes por millón ARNsi o ARNds sobre la dieta para CRW del bioensayo como se describió precedentemente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas CRW que se alimentaban de la dieta que contiene el ARNds correspondiente a todo o una parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº: 64 muestra una inhibición del crecimiento y mortalidad significativos en comparación con los controles.

- Una secuencia homóloga al factor 1 de ribosilación de ADP

Se demostró que los factores de ribosilación son esenciales en la función celular porque juegan roles integrales en el proceso de reparación del daño del ADN, en la carcinogénesis, en la muerte celular, y en la estabilidad genómica. De esta manera, sería útil poseer la capacidad de interrumpir selectivamente la transcripción de factores de ribosilación de ADP en especies de invertebrados que constituyen pestes, utilizando una inhibición mediada por ARN doble cadena

Se identificó un número de secuencias de cADN del CRW que, según se predijo, codifican secuencias aminoacídicas que exhiben homología con las proteínas que son factores de ribosilación de ADP. Una agrupación UNIGENE en particular (Grupo 88_1) estaba compuesta de alrededor de treinta (30) unidades simples EST que, según se predijo, cada una de ellas codificaba toda o parte de una proteína homóloga a la actina. Luego del alineamiento de estas unidades en la agrupación, se derivó la secuencia consenso que se muestra en

la SEQ ID Nº:65 La traducción de la secuencia aminoacídica de la secuencia única del cADN del CRW, que comprendía a esta agrupación, predijo una secuencia aminoacídica que exhibía homología con los homólogos del factor de ribosilación de ADP Las secuencias de las proteínas del factor de ribosilación de ADP que exhibían una homología significativa con la secuencia aminoacídica deducida del ORF (marco de lectura abierta) que se encuentra dentro de la SEQ ID Nº:65 incluían, pero no estaban limitadas a, un factor de ribosilación de ADP de *Drosophila melanogaster* (GenBank, Nº Acceso Y10618), un factor de ribosilación de ADP de *Drosophila obscura* (GenBank, Nº Acceso AF025798), un factor de ribosilación de ADP de *Anopheles gambiae* (GenBank, Nº Acceso. L11617), y un factor de ribosilación de ADP de una mosca azul de la carne de oveja Australiana (*Lucilia cuprina*) (GenBank, Nº Acceso. AF218587)

Las secuencias SEQ ID Nº.66 y SEQ ID Nº 67 corresponden a los cebadores de amplificación directo e inverso, respectivamente (esto es, un par de cebadores) que se utilizan para producir un amplicón a partir del ADN genómico del CRW, de agrupaciones de mARN del CRW, o a partir de secuencias de cADN derivadas de dichas agrupaciones La secuencia de una amplicón de ese tipo debería corresponder a todo o a una parte de un gen del CRW que codifique a una proteína homóloga al factor de ribosilación de ADP. Cada una de las secuencias SEQ ID Nº 66 y SEQ ID Nº:67 contiene una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos ubicada a partir de las posiciones de los nucleótidos 1-23, respectivamente Los nucleótidos 24-42, que se muestran en la SEQ ID Nº:66, corresponden a los nucleótidos 70-88, que se muestran en la SEQ ID Nº:65 Los nucleótidos 24-40, que se muestran en la SEQ ID Nº 67, corresponden a la secuencia complementaria de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº:65 desde los nucleótidos 352-368. Utilizando el par de cebadores que consiste en la SEQ ID Nº.66 y la SEQ ID Nº:67 en una reacción

de amplificación con ADN genómico del CRW como molde, se produce un amplicón de 345 pares de bases que comprende a la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº.68, que corresponde substancialmente a una parte del genoma del CRW que codifica a una proteína que exhibe homología con otra proteína, que es factor de ribosilación de ADP La secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº:68, desde el nucleótido 24 aproximadamente hasta aproximadamente el 322, corresponde substancialmente a la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 65 desde los nucleótidos 70-368.

Al clonar un amplicón que exhibía la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº 68 en un vector plasmídico, se recupera una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir una transcripción in vitro de la ARN polimerasa T7 desde los promotores convergentes T7 ubicados en ambos extremos del amplicón clonado Se produce ARN doble cadena y una muestra es sujeta a un bioensayo, un segmento del ARN, la hebra codificante, consiste en la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 68 desde alrededor de la posición del nucleótido 24 hasta al menos alrededor de la posición del nucleótido 322, excepto por la presencia de un residuo de uridina en cada una de las posiciones en las que se muestra un residuo de timidina en la SEQ ID Nº 68, y el segmento complementario del ARN, o la hebra no codificante, es substancialmente la secuencia complementaria de la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº.68, desde alrededor de la posición del nucleótido 322 hasta alrededor de la posición del nucleótido 24, estando las uridinas apropiadamente ubicadas en el lugar de las timidinas Una muestra de ARN doble cadena (dsARN) es tratada con DICER o con la ARNasa III para producir suficientes cantidades de ARN pequeño de interferencia (siARN) Los bioensayos de dieta del CRW son recubiertos por las muestras que contenían siARN o dsARN en 0,15 partes por millón, del modo en que se describió con

anterioridad, y se permite la alimentación de las larvas durante 13 días Las larvas del CRW que se alimentan con la dieta que contiene a los dsARN correspondientes a toda o parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 68 exhiben una inhibición del crecimiento y una mortalidad significativas en comparación con los controles.

- Una secuencia homóloga a la proteína Factor de Transcripción IIB

Los factores de elongación de la transcripción y de terminación de la transcripción son, como se indicó con anterioridad, esenciales para el metabolismo y pueden ser blancos ventajosos en la inhibición mediada por ARN doble cadena para controlar o eliminar la infestación por pestes de invertebrados

Se identificó una secuencia de cADN del CRW de la cual se había predicho que codificaba una secuencia aminoacídica que exhibía homología con una proteína que es un factor de transcripción IIB La SEQ ID Nº 69 sirvió como base para la construcción de un par de cebadores para usar en la amplificación de una secuencia que se encuentra dentro del genoma del CRW y que codifica el mARN que formó la base para esta secuencia de cADN

La SEQ ID Nº:70 y la SEQ ID Nº·71 corresponden a los cebadores de la ampificación térmica directo e inverso respectivamente (esto es, un par de cebadores) para ser utilizados en la producción de un amplicón a partir del ADN genómico del CRW, a partir de agrupaciones de mARN del CRW, o a partir de cADN derivado de dichas agrupaciones. La secuencia de dicho amplicón deberá corresponder a toda o una parte de un gen del CRW que codifique a una proteína homóloga al factor de transcripción IIB. Cada una de las secuencias SEQ ID Nº 70 y SEQ ID Nº:71contiene una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos ubicada a partir de las posiciones de los nucleótidos 1-23, respectivamente Los nucleótidos 24-44, que se muestran en la SEQ ID Nº 70, corresponden a los nucleótidos 4-24, que se muestran en la

SEQ ID Nº:69 Los nucleótidos 24-44, que se muestran en la SEQ ID Nº:71, corresponden a la secuencia complementaria de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº.69, a partir de los nucleótidos 409-429 Utilizando el par de cebadores que consiste en las secuencias SEQ ID Nº 70 y SEQ ID Nº·71, en una reacción de amplificación con ADN genómico del CRW como molde, se produce un amplicón de 472 pares de bases que comprende a la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº:72, y que corresponde substancialmente a una parte del genoma del CRW que codifica a una proteína que exhibe homología con una proteína que es un factor de transcripción IIB La secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 72, desde alrededor del nucleótido 24 hasta alrededor del nucleótido 449 corresponde substancialmente a la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº:69 a partir de los nucleótidos 4-429

Al clonar un amplicón que exhibía la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº:72 en un vector plasmídico, se recupera una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir una transcripción in vitro de la ARN polimerasa T7 desde los promotores convergentes T7 ubicados en ambos extremos del amplicón clonado. Se produce ARN doble cadena y una muestra es sujeta a un bioensayo, un segmento del ARN, la hebra codificante, consiste en la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 72, desde alrededor de la posición del nucleótido 24 hasta al menos alrededor de la posición del nucleótido 449, excepto por la presencia de un residuo de uridina en cada una de las posiciones en las que se muestra un residuo de timidina en la SEQ ID Nº:72, y el segmento complementario del ARN (o la hebra no codificante), es substancialmente la secuencia complementaria de la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº·72, desde alrededor de la posición del nucleótido 449 hasta alrededor de la posición del nucleótido 24, estando las uridinas apropiadamente ubicadas en el lugar de las timidinas Una muestra de

ARN doble cadena (dsARN) es tratada con DICER o con la ARNasa III para producir suficientes cantidades de ARN pequeño de interferencia (siARN) Los bioensayos de dieta del CRW fueron recubiertos por las muestras que contenían siARN o dsARN en 0,15 partes por millón, del modo en que se describió con anterioridad, y se permitió la alimentación de las larvas durante 13 días. Las larvas del CRW que se alimentan con la dieta que contiene a los dsARN correspondientes a toda o parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 72 exhiben una inhibición del crecimiento y una mortalidad significativas en comparación con los controles.

- Secuencias homólogas a la Quitinasa

La quitina es un homopolímero β(1→ 4) de N-acetilglucosamina y es encontrada en los exoesqueletos de los insectos La quitina se forma a partir de UDP-N-acetilglucosamina en una reacción catalizada por la quitina sintetasa. La quitina es un polisacárido homopolímero estructural, y hay muchos pasos enzimáticos involucrados en la construcción de esta estructura altamente ramificada, que posee enlaces cruzados La quitina les da forma, rigidez y soporte a los insectos y les provee del andamiaje al cual los órganos internos, como por ejemplo los músculos, se sujetan La quitina debe a su vez ser degradada hasta algún punto para mediar los pasos involucrados en el proceso de muda de los insectos. Por lo tanto, se cree que la inhibición mediada por ARN de doble cadena de las proteínas de estas sendas sería útil como un medio para controlar la infestación de las pestes de invertebrados.

Se identificó información de la secuencia de amino ácidos a partir de la traducción de las secuencias de una biblioteca de cADN producida a partir del intestino medio del gusano de la ráíz del maíz, que exhibían homología con proteínas con actividad de quitinasa. Se generó una secuencia consenso para la quitinasa (Agrupación de UNIGENE No 716_1, SEQ ID Nº 73) a partir del alineamiento de dos únicas secuencias EST. Se generó una segunda

secuencia consenso para la quitinasa (Agrupación de UNIGENE No 1238_1, SEQ ID Nº 77) a partir del alineamiento de cuatro únicas secuencias La traducción de las secuencias aminoacídicas derivadas de los ORF que se ubican dentro de estos UNIGENE fueron anotados a la secuencia aminoacídica de la quitinasa (GenBank, Nº Acceso Y18011) de un escarabajo de la mostaza (*Phaedon cochleariae*). La SEQ ID Nº 73 y la SEQ ID Nº:77 sirvieron como base para la construcción de pares de cebadores para ser utilizados en la amplificación de dos secuencias que se encuentran dentro del genoma del CRW, en agrupaciones de mARN del CRW, o en secuencias de cADN derivadas de dichas agrupaciones de mARN La secuencia nucleotídica de dichos amplicones debería corresponder a toda o una parte de un gen que codifique a una proteína homóloga a la quitinasa.

La SEQ ID Nº 74 y la SEQ ID Nº 75 corresponden a los cebadores de la amplificación térmica directo e inverso respectivamente (esto es, un par de cebadores) para ser utilizados en la producción de un amplicón a partir de las secuencias nucleotídicas derivadas de un gusano de la raíz del maíz La secuencia de dicho amplicón deberá corresponder a toda o a una parte de un gen del CRW que se muestra en la SEQ ID Nº 73 que codifica a una proteína homóloga a la quitinasa Cada una de las secuencias SEQ ID Nº.74 y SEQ ID Nº·75 contiene una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos ubicada a partir de las posiciones de los nucleótidos 1-23, respectivamente Los nucleótidos 24-42 que se muestran en la SEQ ID Nº 74 corresponden a los nucleótidos 1-19 que se muestran en la SEQ ID Nº:73. Los nucleótidos 24-47 que se muestran en la SEQ ID Nº 75 corresponden a la secuencia complementaria que se muestra en la SEQ ID Nº.73, a partir de los nucleótidos 470-493 Utilizando el par de cebadores que consiste en la SEQ ID Nº·74 y la SEQ ID Nº·75 en una reacción de amplificación con ADN genómico del CRW como molde, se produce un amplicón de 472 pares de bases que comprende a la secuencia

nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº.76, que corresponde substancialmente a una parte del genoma del CRW que codifica a una proteína que exhibe homología con otra proteína con actividad quitinasa La secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 76 desde el nucleótido 24 aproximadamente hasta aproximadamente el nucleótido 516 corresponde substancialmente a la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 76, a partir de los nucleótidos 1-493

Al clonar un amplicón que exhibía la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº 76 en un vector plasmídico, se recupera una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir una transcripción in vitro de la ARN polimerasa T7 desde los promotores convergentes T7 ubicados en ambos extremos del amplicón clonado Se produce ARN doble cadena y una muestra es sujeta a un bioensayo; un segmento del ARN, la hebra codificante, consiste en la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº:76, desde alrededor de la posición del nucleótido 24 hasta al menos alrededor de la posición del nucleótido 516, excepto por la presencia de un residuo de uridina en cada una de las posiciones en las que se muestra un residuo de timidina en la SEQ ID Nº 76, y el segmento complementario del ARN (o la hebra no codificante), es substancialmente la secuencia complementaria de la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 76, desde alrededor de la posición del nucleótido 516 hasta alrededor de la posición del nucleótido 24, estando las uridinas apropiadamente ubicadas en el lugar de las timidinas Una muestra de ARN doble cadena (dsARN) es tratada con DICER o con la ARNasa III para producir suficientes cantidades de ARN pequeño de interferencia (siARN) Los bioensayos de dieta del CRW fueron recubiertos por las muestras que contenían siARN o dsARN en 0,15 partes por millón, del modo en que se describió con anterioridad, y se permitió la alimentación de las larvas durante 13 días Las larvas del CRW que se alimentan con la dieta que contiene a los

dsARN correspondientes a toda o parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 76 exhiben una inhibición del crecimiento y una mortalidad significativas en comparación con los controles.

Las secuencias SEQ ID Nº:78 y SEQ ID Nº:79 corresponden a los cebadores de amplificación genómica directa e inversa, respectivamente (esto es, un par de cebadores) que se utilizan para producir un amplicón a partir del ADN genómico del CRW, de agrupaciones de mARN del CRW, o a partir de secuencias de cADN derivadas de dichas agrupaciones. La secuencia de un amplicón de ese tipo debería corresponder a todo o a una parte del gen del CRW que se muestra en la SEQ ID Nº·77 que codifica a una proteína homóloga a la quitinasa Cada una de las secuencias SEQ ID Nº:78 y SEQ ID Nº 79 contiene una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos ubicada a partir de las posiciones de los nucleótidos 1-23, respectivamente Los nucleótidos 24-44 que se muestran en la SEQ ID Nº 78 corresponden a los nucleótidos 64-84 que se muestran en la SEQ ID Nº:77 Los nucleótidos 24-44 que se muestran en la SEQ ID Nº 79 corresponden a la secuencia complementaria de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 77, desde los nucleótidos 779-799 Utilizando el par de cebadores que consiste en la SEQ ID Nº:78 y SEQ ID Nº.79 en una reacción de amplificación con ADN genómico del CRW como molde, se produjo un amplicón de 912 pares de bases que comprendía a la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº:80. Un alineamiento de la secuencia del cADN que se muestra en la SEQ ID Nº·77 y de la secuencia del amplicón, reveló que había una disimilitud substancial entre las dos secuencias, resultando en una identidad de secuencia de sólo alrededor de 32% Es preferible producir un amplicón utilizando pares de cebadores como los de este tipo, que se muestran en las secuencias SEQ ID Nº 78 y ·79, y como molde, mARN o cADN, con el objeto de evitar dichas inconsistencias.

Al clonar un amplicón que exhibía la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº·77 en un vector plasmídico, se recupera una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir una transcripción in vitro de la ARN polimerasa T7 desde los promotores convergentes T7 ubicados en ambos extremos del amplicón clonado. Se produce ARN doble cadena y una muestra es sujeta a un bioensayo, un segmento del ARN, la hebra codificante, consiste en la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 77 desde alrededor de la posición del nucleótido 64 hasta al menos alrededor de la posición del nucleótido 799, excepto por la presencia de un residuo de uridina en cada una de las posiciones en las que se muestra un residuo de timidina en la SEQ ID Nº 77, y el segmento complementario del ARN (o la hebra no codificante), es substancialmente la secuencia complementaria de la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº·77, desde alrededor de la posición del nucleótido 799 hasta alrededor de la posición del nucleótido 64, estando las uridinas apropiadamente ubicadas en el lugar de las timidinas. Una muestra de ARN doble cadena (dsARN) es tratada con DICER o con la ARNasa III para producir suficientes cantidades de ARN pequeño de interferencia (siARN) Los bioensayos de dieta del CRW fueron recubiertos por las muestras que contenían siARN o dsARN en 0,15 partes por millón, del modo en que se describió con anterioridad, y se permitió la alimentación de las larvas durante 13 días. Las larvas del CRW que se alimentan con la dieta que contiene a los dsARN correspondientes a toda o parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº.77 exhiben una inhibición del crecimiento y una mortalidad significativas en comparación con los controles

- Una secuencia homóloga a una enzima que conjuga ubiquitina

La senda de la ubiquitina juega un rol importante en el control del ciclo celular mediante la degradación específica de un número de proteínas regulatorias que incluyen a las ciclinas mitóticas y a los inhibidores de las

quinasas dependientes de ciclinas como el p27 de las células de mamífero. Por lo tanto, los genes que codifican a la ubiquitina y a los componentes asociados pueden ser un blanco preferido para la inhibición mediada por ARN de doble cadena (Smith et al., Plant Phys. 1997, 113.281-291) La senda proteolítica dependiente de ubiquitina es una de las principales rutas por la que las proteínas intracelulares son destruidas selectivamente en los eucariotas. La conjugación de la ubiquitina a las proteínas substrato está mediada por una colección marcadamente diversa de enzimas. El proceso de hacer blanco proteolítico a una proteína también puede estar regulado en los pasos que ocurren entre la ubiquitinación del substrato y su degradación hasta péptidos por la proteasa de múltiples subunidades de 26S. La complejidad del sistema de ubiquitina sugiere un rol central para el recambio de proteínas en la regulación de las células eucariotas, e implica a otras proteínas de la senda, que incluyen a la enzima activadora de la ubiquitina, a la enzima que conjuga a la ubiquitina, a la proteína ligasa de ubiquitina, y a las subunidades componentes del proteasoma de 26S. Por lo tanto, se cree que la inhibición mediada por ARN de doble cadena de las proteínas de esta senda sería útil como un medio para controlar la infestación de las pestes de invertebrados

Se identificó una secuencia de cADN del CRW de la cual se había predicho que codificaba una secuencia aminoacídica que exhibía homología con una enzima que conjuga ubiquitina. La SEQ ID Nº:81 sirvió como base para la construcción de un par de cebadores para usar en la producción de un amplicón que comprenda a toda o una parte de una enzima que conjugue ubiquitina a partir del gusano de la raíz del maíz

La SEQ ID Nº.82 y la SEQ ID Nº:83 corresponden a los cebadores para la amplificación genómica directo e inverso respectivamente (esto es, un par de cebadores) para ser utilizados en la producción de un amplicón a partir del ADN genómico del CRW, a partir de agrupaciones de mARN del CRW, o a

partir de cADN derivado de dichos agrupaciones de mARN. La secuencia de dicho amplicón deberá corresponder a toda o a una parte de un gen del CRW que codifique a una proteína homóloga a la enzima que conjuga ubiquitina Cada una de las secuencias SEQ ID Nº·82 y SEQ ID Nº 83 contiene una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos ubicada a partir de las posiciones de los nucleótidos 1-23, respectivamente Los nucleótidos 24-42 que se muestran en la SEQ ID Nº.82 corresponden a los nucleótidos 16-34 que se muestran en la SEQ ID Nº 81 Los nucleótidos 24-42 que se muestran en la SEQ ID Nº 83 corresponden a la secuencia complementaria de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº:81 a partir de los nucleótidos 295-313. Utilizando el par de cebadores que consiste en la SEQ ID Nº.82 y la SEQ ID Nº 83 en una reacción de amplificación con ADN genómico del CRW como molde, se produce un amplicón de 344 pares de bases que comprende a la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 84, que corresponde substancialmente a una parte del genoma del CRW que codifica a una proteína que exhibe homología con una enzima que conjuga ubiquitina. La secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº:84 desde el nucleótido 24 aproximadamente hasta aproximadamente el nucleótido 321 corresponde substancialmente a la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº:81 desde los nucleótidos 16-313.

Al clonar un amplicón que exhibía la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº.84 en un vector plasmídico, se recupera una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir una transcripción in vitro de la ARN polimerasa T7 desde los promotores convergentes T7 ubicados en ambos extremos del amplicón clonado Se produce ARN doble cadena y una muestra es sujeta a un bioensayo, un segmento del ARN, la hebra codificante, consiste en la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº·84 desde alrededor de la posición del nucleótido 24 hasta al menos alrededor de la posición del

nucleótido 253, excepto por la presencia de un residuo de uridina en cada una de las posiciones en las que se muestra un residuo de timidina en la SEQ ID Nº 84, y el segmento complementario del ARN, o la hebra no codificante, es substancialmente la secuencia complementaria de la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº:84, desde alrededor de la posición al menos del nucleótido 253 hasta alrededor de la posición del nucleótido 24, estando las uridinas apropiadamente ubicadas en el lugar de las timidinas. Una muestra de ARN doble cadena (dsARN) es tratada con DICER o con la ARNasa III para producir suficientes cantidades de ARN pequeño de interferencia (siARN) Los bioensayos de dieta del CRW fueron recubiertos por las muestras que contenían siARN o dsARN en 0,15 partes por millón, del modo en que se describió con anterioridad, y se permitió la alimentación de las larvas durante 13 días Las larvas del CRW que se alimentan con la dieta que contiene a los dsARN correspondientes a toda o a una parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 84 exhiben una inhibición del crecimiento y una mortalidad significativas en comparación con los controles

- Una secuencia homóloga a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

La senda glicolítica es una senda esencial en la mayoría de los organismos y está involucrada en la producción de energía metabólica a partir de la degradación de la glucosa Una enzima importante en el segundo paso de la senda glicolítica es la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), la cual, en presencia de NAD^+ y fosfato inorgánico, cataliza la oxidación de gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato junto con la formación de NADH. El evento importante de esta reacción, es el almacenamiento de energía a través de la formación de NADH Los genes que codifican enzimas asociadas con la senda glicolítica, y particularmente los genes que codifican enzimas involucradas en los pasos útiles para la formación de reservas energéticas

pueden ser blancos particularmente ventajosos para la inhibición mediada por ARN doble cadena en pestes constituidas por especies de invertebrados

Se identificó una secuencia de una biblioteca de cADN del CRW de la cual se había predicho que codificaba una secuencia aminoacídica que exhibía homología con una proteína de actividad gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). La secuencia consenso para la agrupación que se muestra en la SEQ ID Nº:85 fue ensamblada a partir de las secuencias superpuestas de tres únicas secuencias EST La traducción de la secuencia aminoacídica de un ORF que se encuentra dentro de la secuencia nucleotídica SEQ ID Nº.85 exhibió homología con la secuencia aminoacídica de G3PDH derivada de un gen de la G3PDH de *Crytococcus curvatus* (GenBank, Nº Acceso AF126158) y con la secuencia aminoacídica de la proteína G3PDH del organismo *Drosophila pseudoobscura* (GenBank, Nº Acceso. AF025809). Por lo tanto, se predijo que la traducción de la secuencia aminoacídica de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº.85 es una parte de una proteína del CRW con la actividad de la enzima G3PDH La secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº.85 sirvió como base para la construcción de un par de cebadores de amplificación térmica para usar en la amplificación de una secuencia que codifica la secuencia de la enzima G3PDH del CRW

La SEQ ID Nº 86 y la SEQ ID Nº 87 corresponden a los cebadores para la ampificación térmica directo e inverso respectivamente (esto es, un par de cebadores) para ser utilizados en la producción de un amplicón a partir de las secuencias nucleotídicas del CRW, ya sea ADN genómico, agrupaciones de mARN, o a partir de secuencias de cADN derivadas de dichas agrupaciones de mARN La secuencia de dicho amplicón deberá corresponder a toda o a una parte de un gen del CRW que codifique a una proteína homóloga a G3PDH Cada una de las secuencias SEQ ID Nº 86 y SEQ ID Nº 87 contiene una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos ubicada a partir de las posiciones de

los nucleótidos 1-23, respectivamente Los nucleótidos 24-45 que se muestran en la SEQ ID Nº.86, corresponden a los nucleótidos 103-124 que se muestran en la SEQ ID Nº:85. Los nucleótidos 24-45 que se muestran en la SEQ ID Nº 87, corresponden a la secuencia complementaria de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 85, a partir de los nucleótidos 573-594 Utilizando el par de cebadores que consiste en las secuencias SEQ ID Nº.86 y SEQ ID Nº 87 en una reacción de amplificación con ADN genómico del CRW como molde, se produce un amplicón de 538 pares de bases que comprende a la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº.88, que corresponde substancialmente a una parte del genoma del CRW que codifica a una proteína que exhibe homología con una enzima que conjuga G3PDH. La secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº:88, desde alrededor del nucleótido 24 hasta alrededor del nucleótido 515 corresponde substancialmente a la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 85 a partir de los nucleótidos 103-594

Al clonar un amplicón que exhibía la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº 88 en un vector plasmídico, se recupera una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir una transcripción in vitro de la ARN polimerasa T7 desde los promotores convergentes T7 ubicados en ambos extremos del amplicón clonado Se produce ARN doble cadena y una muestra es sujeta a un bioensayo; un segmento del ARN, la hebra codificante, consiste en la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 88 desde alrededor de la posición del nucleótido 24 hasta al menos alrededor de la posición del nucleótido 515, excepto por la presencia de un residuo de uridina en cada una de las posiciones en las que se muestra un residuo de timidina en la SEQ ID Nº 88, y el segmento complementario del ARN, o la hebra no codificante, es substancialmente la secuencia complementaria de la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 88, desde alrededor de la posición del

nucleótido 515 hasta alrededor de la posición del nucleótido 24, estando las uridinas apropiadamente ubicadas en el lugar de las timidinas Una muestra de ARN doble cadena (dsARN) es tratada con DICER o con la ARNasa III para producir suficientes cantidades de ARN pequeño de interferencia (siARN) Los bioensayos de dieta del CRW fueron recubiertos por las muestras que contenían siARN o dsARN en 0,15 partes por millón, del modo en que se describió con anterioridad, y se permitió la alimentación de las larvas durante 13 días. Las larvas del CRW que se alimentan con la dieta que contiene a los dsARN correspondientes a toda o a una parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°·88 exhiben una inhibición del crecimiento y una mortalidad significativas en comparación con los controles.

- Una secuencia homóloga a la ubiquitina B

Como se describió con anterioridad, la senda de ubiquitina para la degradación de proteínas juega un rol importante en el control del ciclo celular mediante la degradación específica de un número proteínas regulatorias que incluyen a las ciclinas mitóticas y a los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas como por ejemplo el p27 de las células de mamíferos Por lo tanto, los genes que codifican a la ubiquitina y a los componentes asociados, pueden ser blancos ,preferidos para la inhibición mediada por ARN doble cadena. (Smith et al., Plant Phys. 1997, 113.281-291).

Se identificó una secuencia de una biblioteca de cADN del CRW de la cual se había predicho que codificaba una secuencia aminoacídica que exhibía homología con una proteína designada en la presente como ubiquitina B. La secuencia consenso para la agrupación de UNIGENE que se muestra en la SEQ ID N°.89 fue ensamblada a partir de las secuencias superpuestas de cuatro únicas secuencias EST La traducción de la secuencia aminoacídica de la SEQ ID N° 89 exhibió homología con una secuencia aminoacídica de poliubiquitina de *Amoeba proteus* (GenBank, N° Acceso. AF034789) y con la

secuencia de la proteína ubiquitina de *Drosophila melanogaster* (GenBank, Nº Acceso M22428) Por lo tanto, se pensó que la traducción de la secuencia aminoacídica de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 89 codifica una ubiquitina B La SEQ ID Nº 89 sirvió como la base para la construcción de un par de cebadores para ser utilizados en una reacción de amplificación térmica para amplificar una secuencia nucleotídica que codifique toda o una parte de la secuencia aminoacídica de la ubiquitina B del gusano de la raíz del maíz.

La SEQ ID Nº:90 y la SEQ ID Nº:91 corresponden a los cebadores para la amplificación térmica directo e inverso respectivamente (esto es, un par de cebadores) para ser utilizados en la producción de un amplicón a partir de las secuencias nucleotídicas derivadas del CRW, ya sea ADN genómico, agrupaciones de mARN, o secuencias de cADN derivadas de dichos agrupaciones de mARN La secuencia de dicho amplicón deberá corresponder a toda o a una parte de un gen del CRW que codifique a una proteína homóloga a la ubiquitina B Cada una de las secuencias SEQ ID Nº 90 y SEQ ID Nº 91 contiene una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos ubicada a partir de las posiciones de los nucleótidos 1-23, respectivamente. Los nucleótidos 24-40, que se muestran en la SEQ ID Nº:90, corresponden a los nucleótidos 62-78, que se muestran en la SEQ ID Nº.89 Los nucleótidos 24-47, que se muestran en la SEQ ID Nº:91, corresponden a la secuencia complementaria de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº:89, a partir de los nucleótidos 399-422. Utilizando el par de cebadores que consiste en las secuencias SEQ ID Nº 90 y SEQ ID Nº.91 en una reacción de amplificación con ADN genómico del CRW como molde, se produce un amplicón de 407 pares de bases que comprende a la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº:92, que corresponde substancialmente a una parte del genoma del CRW que codifica a una proteína que exhibe homología con una enzima que conjuga ubiquitina. La secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº:92,

desde alrededor del nucleótido 24 hasta alrededor del nucleótido 384 corresponde substancialmente a la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº.89 a partir de los nucleótidos 62-422

Al clonar el amplicón que exhibía la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº 92 en un vector plasmídico, se recupera una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir una transcripción in vitro de la ARN polimerasa T7 desde los promotores convergentes T7 ubicados en ambos extremos del amplicón clonado Se produce ARN doble cadena y una muestra es sujeta a un bioensayo, un segmento del ARN, la hebra codificante, consiste en la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº:92 desde alrededor de la posición del nucleótido 24 hasta al menos alrededor de la posición del nucleótido 384, excepto por la presencia de un residuo de uridina en cada una de las posiciones en las que se muestra un residuo de timidina en la SEQ ID Nº 92, y el segmento complementario del ARN, o la hebra no codificante, es substancialmente la secuencia complementaria de la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº.92, desde alrededor de la posición del nucleótido 384 hasta al menos alrededor de la posición del nucleótido 24, estando las uridinas apropiadamente ubicadas en el lugar de las timidinas Una muestra de ARN doble cadena (dsARN) es tratada con DICER o con la ARNasa III para producir suficientes cantidades de ARN pequeño de interferencia (siARN). Los bioensayos de dieta del CRW fueron recubiertos por las muestras que contenían siARN o dsARN en 0,15 partes por millón, del modo en que se describió con anterioridad, y se permitió la alimentación de las larvas durante 13 días Las larvas del CRW que se alimentan con la dieta que contiene a los dsARN correspondientes a toda o a una parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº:92 exhiben una inhibición del crecimiento y una mortalidad significativas en comparación con los controles

- Un homólogo de la hormona juvenil esterasa

Como se indicó con anterioridad, la hormona juvenil (HJ) de los insectos controla y regula una variedad de procesos biológicos necesarios dentro del ciclo de vida del insecto que incluyen pero no necesariamente están limitados a la metamorfosis, la reproducción, y la diapausa La interrupción de las sendas de síntesis o degradación de la HJ, mediante la utilización de la tecnología de la supresión génica, podría ser un blanco efectivo para la inhibición de pestes mediada por ARN doble cadena.

Se identificó una secuencia derivada del CRW homóloga a la de la hormona juvenil esterasa para ser utilizada en la presente invención. La SEQ ID Nº 93 corresponde substancialmente a la secuencia nucleotídica de un cADN del intestino medio del CRW La traducción de la secuencia aminoacídica de la SEQ ID Nº.93 predijo homología con la hormona juvenil esterasa (HJE). La SEQ ID Nº 94 y la SEQ ID Nº.95 corresponden a los cebadores para la amplificación térmica, directo e inverso respectivamente (esto es, un par de cebadores) para ser utilizados en la producción de un amplicón a partir de ADN genómico del CRW, de agrupaciones de mARN del CRW, o de secuencias de cADN del CRW derivadas de dichos agrupaciones de mARN La secuencia de dicho amplicón deberá corresponder a toda o a una parte de un gen del CRW que codifique a una proteína homóloga a HJE Cada una de las secuencias SEQ ID Nº:94 y SEQ ID Nº 95 contiene una secuencia promotora T7 de 23 nucleótidos ubicada a partir de las posiciones de los nucleótidos 1-23, respectivamente. Los nucleótidos 24-45, que se muestran en la SEQ ID Nº 94, corresponden a los nucleótidos 58-79, que se muestran en la SEQ ID Nº 93 Los nucleótidos 24-46, que se muestran en la SEQ ID Nº 95, corresponden a la secuencia complementaria de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 93, a partir de los nucleótidos 338-360 Utilizando el par de cebadores que consiste en las secuencias SEQ ID Nº·94 y SEQ ID Nº.95 en una reacción de amplificación con ADN genómico del CRW como molde, se produce un

amplicón de 348 pares de bases que comprende a la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 96 Es preferible producir un amplicón usando como molde de secuencia nucleotídica en la reacción de amplificación a una agrupación de mARN del CRW o un cADN derivado de dicha agrupación

Al clonar el amplicón que exhibía la secuencia correspondiente a la SEQ ID Nº:96 en un vector plasmídico, se recupera una cantidad suficiente de ADN plasmídico como para permitir una transcripción in vitro de la ARN polimerasa T7 desde los promotores convergentes T7 ubicados en ambos extremos del amplicón clonado. Se produce ARN doble cadena y una muestra es sujeta a un bioensayo, un segmento del ARN, la hebra codificante, consiste en la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº:96 desde alrededor de la posición del nucleótido 45 hasta al menos alrededor de la posición del nucleótido 302, excepto por la presencia de un residuo de uridina en cada una de las posiciones en las que se muestra un residuo de timidina en la SEQ ID Nº:96, y el segmento complementario del ARN, o la hebra no codificante, es substancialmente la secuencia complementaria de la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 96, desde alrededor de la posición del nucleótido 302 hasta al menos alrededor de la posición del nucleótido 45, estando las uridinas apropiadamente ubicadas en el lugar de las timidinas. Una muestra de ARN doble cadena (dsARN) es tratada con DICER o con la ARNasa III para producir suficientes cantidades de ARN pequeño de interferencia (siARN). Los bioensayos de dieta del CRW fueron recubiertos por las muestras que contenían siARN o dsARN en 0,15 partes por millón, del modo en que se describió previamente, y se permitió la alimentación de las larvas durante 13 días. Las larvas del CRW que se alimentan con la dieta que contiene a los dsARN correspondientes a toda o a una parte de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 96 exhiben una inhibición del crecimiento y una mortalidad significativas en comparación con los controles

Se evaluaron diez de las moléculas de ARN doble cadena en un bioensayo en paralelo con los ARN pequeños de interferencia generados a partir de las moléculas de ARN doble cadena. Se aplicaron muestras de secuencia de ARN doble cadena o muestras de ARN pequeño de interferencia preparadas a partir de las muestras de secuencia de ARN doble cadena, correspondiendo cada una a secuencias aminoacídicas anotadas para genes homólogos de los genes blanco seleccionados que incluyen a un homólogo de la V-ATPasa de 40 kDa, un homólogo de la EF-1-alfa, un homólogo de la subunidad p28 del proteasoma de 26S, un homólogo de la hormona juvenil epóxido hidrolasa, un homólogo de la CHD3, un homólogo de la beta-tubulina, dos homólogos de la quitinasa, un homólogo del factor de transcripción IIB, y un homólogo de la hormona juvenil esterasa (correspondientes respectivamente a las secuencias SEQ ID Nº 35, SEQ ID Nº 39, SEQ ID Nº.47, SEQ ID Nº·52, SEQ ID Nº:7, SEQ ID Nº 21, SEQ ID Nº·76, SEQ ID Nº 80, SEQ ID Nº·72, y SEQ ID Nº·96) a la dieta de los insectos en una concentración de alrededor de diez partes por millón (se añadieron 30 microlitros de una solución que contenía una muestra de ARN doble cadena ajustada a una concentración apropiada a los pocillos de la placa de micro titulación que contenían 200 microlitros de la dieta de insecto por pocillo) Para cada muestra se utilizó un total de dieciocho pocillos. Se agregó una única larva de primer instar a cada pocillo luego de que las muestras de ARN hubieron difundido en la dieta. Los bioensayos fueron incubados del modo en que se indicó con anterioridad durante aproximadamente 13 días y fueron monitoreados diariamente en cuanto a morbilidad y mortalidad. Se utilizó una proteína insecticida cristalina, variante en secuencia aminoacídica, Cry3Bb1, que fue designada como una proteína insecticida 11231 en English et al. (Patente de los EEUU No 6,642,030), como un control positivo para observar bioactividad insecticida específica para la peste del gusano de la raíz. Se aplicó Cry3Bb a la dieta

como se muestra en English et al , excepto en que la concentración de Cry3Bb en la dieta fue ajustada para ser alrededor de 200-300 partes por millón También se incluyó una muestra control separada que fue tratada solo con solución amortiguadora o con agua También se incluyeron una muestra control de ARN doble cadena y una muestra control de ARN pequeño de interferencia producida a partir de las muestras control de ARN doble cadena como controles negativos adicionales (MEGAscript® iARN Conjunto de elementos, AMBION, Austin, Texas)

La evaluación inicial utilizando moléculas de ARN doble cadena derivadas de estas diez secuencias indicó que las larvas a las cuales se les permitió alimentarse de una dieta que contenía ARN doble cadena correspondiente a un homólogo de la V-ATPasa de 40 kDa (SEQ ID Nº 35), a un homólogo de la CHD3 (SEQ ID Nº 7), y a un homólogo de la beta-tubulina (SEQ ID Nº 31), exhibieron una mortalidad significativa en comparación con los controles. Basándose en estos resultados, se llevaron a cabo bioensayos adicionales para evaluar si las partículas de ARN pequeño de interferencia, doble cadena, serían más efectivas que las moléculas de ARN doble cadena de largo completo.

- Una secuencia homóloga a la alfa tubulina

Las células eucariotas generalmente utilizan los elementos estructurales del citoesqueleto que son importantes, no sólo como un andamio mecánico, sino también sosteniendo la forma de la célula. Los microfilamentos, que son semiflexibles, dan movilidad a la célula, la ayudan a dividirse durante la mitosis (citocinesis) y, en animales vertebrados e invertebrados, son responsables de la contracción muscular Los microtúbulos, que son relativamente rígidos y que están hechos de proteínas alfa y beta tubulina, juegan un rol importante actuando como una especie de autopista para el transporte de vesículas y organelas, y en la separación de los cromosomas durante la mitosis

(cariocinesis). Los filamentos intermedios, que son flexibles, proveen al menos una fuerza adicional a la estructura celular global También se sabe que el citoesqueleto está involucrado en la señalización a través del citoplasma celular Teniendo en cuenta estas funciones, se cree que cualquier interrupción del citoesqueleto o aún ligeros cambios en su integridad pueden causar consecuencias patológicas a una célula

Se identificó al menos una secuencia de una biblioteca de cADN del CRW de la cual se había predicho que codificaba una secuencia aminoacídica que exhibía homología con la proteína designada en la presente como alfa tubulina, y más específicamente referida en la presente con la SEQ ID Nº 163 según lo dispuesto en el listado de secuencias Se pensó que la traducción de la secuencia aminoacídica de la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº:163 codificaba una proteína alfa tubulina o un fragmento de la misma La SEQ ID Nº 163 sirvió como la base para la construcción de una secuencia que se predijo que formaba un ARN doble cadena al ser expresada en *E coli* a partir de un promotor T7 o en una planta a partir de un promotor funcional de plantas Una secuencia que sirve como la base para una secuencia que codifica un ARN doble cadena de ese tipo es la SEQ ID Nº 97 que se muestra en la lista de las secuencias desde la posición del nucleótido 58 hasta la posición del nucleótido 1010 Puede expresarse esta secuencia como una molécula de ARN, para posteriormente purificarla y evaluarla en ensayos de alimentación in vitro, con la finalidad de determinar la inhibición del gusano de la raíz del maíz

Se introdujo un promotor para la ARN polimerasa T7 río arriba de una secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 97 desde la posición del nucleótido 58 hasta la posición del nucleótido 1010, y se produjo ARN a partir de esta construcción (pIC17527). El ARN de este tipo fue evaluado en triplicado en un ensayo de alimentación in vitro contra gusanos de la raíz del

maíz, contra un control positivo de beta tubulina (descripto en la presente con anterioridad), 200 ppm de Cry3Bb, y un control sin tratamiento, y se determinó la mortalidad media. Las muestras control sin tratamiento exhibieron una mortalidad menor a alrededor de 3-5 % mientras que todas las otras muestras de prueba exhibieron una mortalidad desde alrededor del 20 hasta alrededor del 55%. Las muestras de Cry3Bb exhibieron desde alrededor del 20 hasta alrededor del 36% de mortalidad, mientras que las muestras de pIC17527 (en 15 ppm) exhibieron desde alrededor del 38 hasta aproximadamente el 45% de mortalidad Las muestras de D8 (beta tubulina como se muestra en la presente, con anterioridad), también en alrededor de 15 ppm, exhibieron desde alrededor del 38 hasta aproximadamente el 52% de mortalidad Basándose en estos resultados, la construcción de alfa tubulina fue colocada bajo el control de un promotor funcional de plantas, utilizada para transformar plantas de maíz, y los eventos de transformación que surgieron de la transformación fueron evaluados en cuanto a su habilidad para resistir a la infestación del gusano de la raíz del maíz

Raíces de plantas de maíz R0 transformadas con una secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID N°.97 Brevemente, la secuencia que codifica una construcción de dsARN en la SEQ ID N°:97 del modo en que se describió con anterioridad, fue unida en su extremo 5' a una secuencia que consistía en un promotor e35S ligado de forma operacional a un intrón de la hsp70 de maíz y en el extremo 3' a un terminador de la transcripción de NOS3' y a una secuencia de poliadenilación. Este *cassette* de expresión fue colocado río abajo de un cassette de selección de glifosato. Estos cassettes unidos fueron colocados entonces en un vector funcional de transformación de plantas, *Agrobacterium tumefaciens,* y el Nuevo vector fue designado como pMON72829 (la construcción de dsARN de alfa tubulina), fue usado para transformar tejido de maíz para la tolerancia al glifosato, y los eventos fueron

seleccionados y transferidos a la tierra Las raíces R0 de planta fueron dadas en alimento para las larvas de los gusanos de la raíz del maíz del oeste (WCR, *Diabrotica virifera)* Las raíces transgénicas de maíz fueron cultivadas en placas de Petri con un medio MS0D que contenía los antibióticos y el glifosato para la selección *in vitro.* Dos larvas de WCR fueron infestadas por raíz en cada placa con un pincel de punta fina Las placas fueron selladas con hojas plásticas para prevenir el escape de las larvas Los ensayos fueron colocados en una incubadora Percival a 27° C y 60% RH en oscuridad completa Se monitoreó la contaminación y la calidad de las larvas Luego de seis días de alimentarse del tejido de la raíz, las larvas fueron transferidas a una dieta de WCR en una placa de 96 pocillos. Se permitió a las larvas alimentarse con la dieta durante ocho días, haciendo que el ensayo completo durara catorce días en total Se registró la masa de las larvas y la supervivencia para el análisis Se realizó un análisis de una vía sobre los datos de masa de las larvas y una prueba de Dunnett's para buscar significancia estadística en comparación con LH244, un control negativo sin transformar Las larvas de WCR resultaron significativamente atrofiadas (α = 0,05) luego de alimentarse en dos eventos, ZM_S125922 y ZM_S125938, y en comparación con el crecimiento de las larvas alimentadas sobre las plantas control negativo ($p<0,02$) Las larvas que se alimentaban sobre las plantas control negativo exhibieron una masa larval media desde alrededor de 0,6 hasta alrededor de 0,8 mg, mientras que las larvas que se alimentaban sobre las raíces transgénicas exhibieron una masa larval media desde alrededor de 0,1 hasta alrededor de 0,2 mg

Las plantas transgénicas de maíz (R0) generadas utilizando pMON72829 fueron plantadas en macetas de 10 pulgadas que contenían tierra Metromix, luego de alcanzar un tamaño apropiado. Cuando las plantas hubieron alcanzado el estadío de crecimiento V4, aproximadamente 1000 huevos de los gusanos de la raíz del maíz del Oeste (WCR, *Diabrotica virifera*)

fueron infestados en la zona de la raíz Se infestó maíz no transgénico del mismo genotipo en un estadío de crecimiento similar para servir como un control negativo Los huevos fueron preincubados para que la eclosión ocurriera dentro de las 24 horas de la infestación Se permitió a las larvas alimentarse del sistema de la raíz durante 3 semanas. Las plantas fueron removidas del suelo y lavadas, de modo que las raíces pudieran ser evaluadas en cuanto a la alimentación de las larvas. Se estimó el daño de la raíz utilizando una Escala de Lesiones de Nódulos (ELN) para puntuar el nivel de daño, donde un 0 indica que no se produjeron daños, un 1 indica que un nódulo de las raíces fue podado hasta 1,5 pulgadas hacia adentro, un 2 indica que 2 nódulos fueron podados, mientras que un 3 indica que 3 nódulos fueron podados. Debido a que las plantas que fueron utilizadas para la evaluación fueron directamente sacadas del cultivo de tejidos luego de la transformación y debido a que los eventos de transformación son únicos, sólo una única planta fue evaluada por evento hasta el momento y no hay estadísticas disponibles Todas las plantas del ensayo presentaron síntomas de la alimentación de las larvas, indicando que se obtuvo una infestación exitosa. Las raíces del control negativo resultaron moderadamente a severamente dañadas promediando en alrededor de 1,9 en la Escala de Lesiones de Nódulos Se evaluaron plantas únicas de ocho eventos transgénicos diferentes. Las raíces de tres de estas plantas transgénicas proveyeron un excelente control de la alimentación de las larvas, promediando alrededor de 0,2 o menos en la Escala de Lesiones de Nódulos Las raíces de dos de las plantas transgénicas exhibieron un daño de alimentación moderado, y otras tres plantas transgénicas no exhibieron control de la alimentación de las larvas Estos datos indicaron que la doble secuencia nucleotídica que codificaba una secuencia de ARN que puede transformarse en un dsARN es completamente capaz de proveer protección contra la infestación de la peste de los gusanos de la raíz cuando es expresada en una planta

transgénica y esa planta es provista en la dieta de la peste de los gusanos de la raíz

Una explicación para la falta de mortalidad observable y consistente o de otros efectos con las secuencias seleccionadas para la supresión génica que incluyen a la EF1alfa, a la subunidad del proteasoma de 26S, y varias otras secuencias de cADN podría ser que, para estos genes, estén presentes homólogos que se expresen dentro de la población de genes que codifican proteínas que tienen funciones similares pero que exhiben suficientes diferencias en la secuencia como para que la senda del iARN no actúe para suprimir al homólogo utilizando las secuencias seleccionadas para la supresión.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra una inhibición significativa de la peste obtenida mediante la alimentación de una peste de un invertebrado con una dieta que contiene secuencias de ARN doble cadena derivadas de esa peste

Se preparó suficiente dieta artificial como para criar a las larvas de los gusanos de la raíz del maíz mediante la aplicación de muestras de secuencias de ARN doble cadena derivadas de seis bibliotecas diferentes de secuencias de cADN del gusano de la raíz. Se permitió a las larvas de los gusanos de la raíz del maíz alimentarse de la dieta durante varios días y se monitoreó la mortalidad, la morbilidad y la atrofia en comparación con los gusanos de la raíz a los que se les permitió alimentarse sólo sobre la dieta control Las secuencias nucleotídicas que fueron utilizadas en la dieta fueron derivadas de las secuencias que se muestran en la SEQ ID Nº 35, en la SEQ ID Nº.39, en la SEQ ID Nº 47, en la SEQ ID Nº 52, en la SEQ ID Nº.7, y en la SEQ ID Nº 31, correspondiendo cada una de ellas a secuencias nucleotídicas derivadas de una biblioteca de cADN del gusano de la raíz del maíz, la secuencia aminoacídica deducida para la traducción de las mismas corresponde

respectivamente a las proteínas anotadas a un homólogo de la V-ATPasa de 40 kDa, a un homólogo de la EF1α, a un homólogo de una subunidad del proteasoma de 26S, a un homólogo de la hormona juvenil epóxido hidrolasa, a un homólogo de la CHD3, y a un homólogo de la β-tubulina.

Se produjeron ARN doble cadena (dsARN) correspondientes a estas secuencias del mismo modo en que se indicó con anterioridad Los siARN fueron generados mediante la escisión de los dsARN correspondientes utilizando la enzima ARNsa III, cuya actividad de escisión del dsARN en fragmentos de dsARN de 12-15 pb que contienen 2 a 3 nucleótidos sobresalientes en el extremo 3', y terminaciones en un fosfato en el extremo 5' y en hidroxilo en el extremo 3' Se esperaba que los siARN producidos de esta manera exhibieran las mismas propiedades que los siARN que podrían ser producidos por la enzima Dicer involucrada en la senda eucariota del iARN

Se colocaron muestras de los dsARN y de los siARN sobre la dieta de los CRW del mismo modo en que se indicó con anterioridad en aproximadamente 0,15 ppm 12 larvas de los gusanos de la raíz del maíz individuales fueron evaluadas de forma separada contra cada una de las muestras de dsARN o de siARN del mismo modo en que se indicó con anterioridad y se les dio un puntaje a los resultados luego de 13 días

Se observó una reducción significativa en la masa de las larvas ($p<0,05$) para las larvas que se alimentaban de la dieta que contenía 0,15 ppm de secuencias de dsARN que se muestran en la SEQ ID Nº 35, en la SEQ ID Nº.52, en la SEQ ID Nº:7, y en la SEQ ID Nº 31 en comparación con el control no tratado (CNT). El siARN correspondiente a las secuencias que se muestran en la SEQ ID Nº 35, en la SEQ ID Nº·39, en la SEQ ID Nº 47, y en la SEQ ID Nº 7 también proveyó una reducción significativa en la masa de las larvas ($p<0,05$) Sin embargo, el tamaño de la muestra de larvas resultó insuficiente como para establecer con certeza que en los casos en que las moléculas de

dsARN o de siARN resultaron en las mayores disminuciones en la masa de las larvas en comparación con los controles esto fue un resultado de la variación natural o claramente fue resultado basado en la inhibición mediada por ARN doble cadena de alguna función biológica dentro de las larvas del gusano de la raíz Por lo tanto, basándose en estos resultados, las secuencias de ARN correspondientes a la SEQ ID Nº.35, a la SEQ ID Nº 39, a la SEQ ID Nº·7, y a la SEQ ID Nº 31 fueron reevaluadas con un mayor tamaño de la muestra de larvas.

- Se aplicaron muestras de dsARN o de siARN a cada uno de los 72 pocillos para cada una de las cuatro secuencias de ARN en la evaluación Cada pocillo se cargo con 0,15 ppm de dsARN o de siARN del modo en que se indicó con anterioridad mediante la aplicación a la superficie de la dieta de un volumen de 30 microlitros que contenía el ARN y permitiendo que la muestra se infunda y que la superficie de la dieta se seque. Se añadió una única larva a cada pocillo y se la incubó durante trece días. Se evaluó la mortalidad y morbilidad de las larvas, y se determinó la masa de las larvas sobrevivientes Los resultados del bioensayo se muestran en la Tabla 1 ----------

- Tabla 1 Resultados de los Bioensayos

ARN	% Mortalidad	Masa (mg)	EE
Resultados de los bioensayos de dsARN			
SEQ ID Nº:35	62,25	0,42	0,12
SEQ ID Nº:39	50,5	0,39	0,05
SEQ ID Nº 7	47,67	0,37	0,05
SEQ ID Nº.31	92,24	0,27	0,05
Control de dsARN[1]	21,08	0,58	0,08
Cry3Bb[2]	42,08	0,21	0,03
CNT	5,58	1,24	0,33

Resultados de los bioensayos de siARN			
SEQ ID Nº 35	21,11	0,45	0,06
SEQ ID Nº 35	21,39	1,31	0,16
SEQ ID Nº:7	15,83	0,73	0,09
SEQ ID Nº.31	20,00	0,39	0,07
Control de siARN[1]	6,52	1,10	0,16
Cry3Bb[2]	27,78	0,49	0,05
CNT	9,45	1,25	0,18

Todas las muestras de siARN se encontraban a 0,15 ppm por pocillo

CNT –TrisHCl 10 mM pH 7,5

EE – error estándar

1- dsARN del fago λ, EPICENTER TECHNOLOGIES, Madison, Wisconsin en el bioensayo del dsARN, MEGAscript® iARN Conjunto de elementos, AMBION, Austin, Texas en el bioensayo del siARN

2- Variante 11231 de Cry3Bb en 300 ppm en el bioensayo del dsARN, 200 ppm en el bioensayo del siARN

Todas las muestras fueron comparadas entre sí utilizando el método de HSD de Tukey en vez de compararlas contra cualquier control único Se observó una atrofia significativa de las larvas para cada uno de los dsARN o siARN evaluados, según se juzga mediante la reducción promedio de la masa de las larvas sobrevivientes en comparación con el control no tratado Siendo más importante, el que las muestras de ARN doble cadena pequeño de interferencia demostraron una habilidad para causar mortalidad y morbilidad (sobre la base de la masa reducida de las larvas) en un nivel que fue al menos tan efectivo como la muestra del control positivo de la variante 11231 de Cry3Bb. Estos resultados sugieren que cualquier molécula de ARN doble cadena derivada de una secuencia de ARN mensajero presente en las células del gusano de la raíz del maíz podría ser efectiva, al ser provista a los gusanos

de la raíz en su dieta, para inhibir la infestación de una especie de planta por la peste del gusano de la raíz

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra sobre secuencias nucleotídicas para la expresión en una célula vegetal, y el efecto de proveer dichas secuencias nucleotídicas en la dieta de un gusano de la raíz del maíz

Una secuencia codificante de la CHD3 derivada de una biblioteca de cADN del gusano de la raíz del maíz fue utilizada para construir una secuencia nucleotídica que codifica un ARN doble cadena estabilizado. Se utilizó una secuencia de cADN que se muestra en la SEQ ID Nº 171 que codifica una parte de un ortólogo o de un homólogo de la secuencia aminoacídica de una CHD3 para construir un par de cebadores para ser utilizados en una reacción de amplificación térmica usando como molde al ADN genómico del gusano de la raíz del maíz. El par de cebadores que se muestra en la SEQ ID Nº 5 y en la SEQ ID Nº 6 permitió la amplificación de un amplicón genómico doble cadena, una hebra del mismo exhibió la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 7. Se produjeron tres segmentos de secuencia nucleotídica a partir de la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº:7. Se produjo un primer segmento nucleotídico (SEQ ID Nº 174) utilizando una secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº·7 como un molde en una reacción de amplificación térmica junto con el par de cebadores de amplificación térmica que exhibía las secuencias que se muestran en la SEQ ID Nº.8 y en la SEQ ID Nº 9 Se produjo un segundo segmento nucleotídico (SEQ ID Nº.13) utilizando una secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 7 como un molde en una reacción de amplificación térmica junto con con el par de cebadores de amplificación térmica que exhibía las secuencias que se muestran en la SEQ ID Nº 11 y en la SEQ ID Nº 12 Se produjo un tercer segmento nucleotídico (SEQ ID Nº:16) utilizando una secuencia nucleotídica que se muestra en la

SEQ ID Nº:7 como un molde en una reacción de amplificación térmica junto con con el par de cebadores de amplificación térmica que exhibía las secuencias que se muestran en la SEQ ID Nº 14 y en la SEQ ID Nº.15 El extremo 3' de una de las hebras del primer segmento es complementario al extremo 3' de una de las hebras del segundo segmento de modo que en una reacción de amplificación térmica que contenga a ambos de estos segmentos, estos extremos complementarios hibriden y permitan una extensión mediada por la polimerasa de ambas hebras a partir de sus respectivos extremos 3' El extremo 3' de la otra hebra del segundo segmento es complementaria al extremo 3' de una de las hebras del tercer segmento, de modo que en una reacción de amplificación térmica que contenga a ambos de estos segmentos, estos extremos complementarios hibriden y permitan una extensión mediada por la polimerasa de ambas hebras a partir de sus respectivos extremos 3' En una reacción de amplificación térmica que contenga a los tres segmentos y a sus secuencias complementarias, esto es, el primero, el segundo y el tercer segmento, junto con las secuencias de los cebadores de amplificación térmica que se muestran en la SEQ ID Nº·8 y en la SEQ ID Nº.15, se produce una nueva secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 17, que al ser colocada bajo el control de un promotor que funcione en plantas, puede producir una secuencia nucleotídica de ARN substancialmente idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº·17 excepto por la presencia de residuos de uridina en los lugares donde se encontraban presentes residuos de timidina Esta secuencia nucleotídica de ARN puede formarse en una molécula estabilizada de ARN en virtud de la complementariedad entre el tercer segmento y el primer segmento, en los cuales la porción de la SEQ ID Nº 17 que corresponde al tercer segmento desde alrededor de la posición del nucleótido 303 hasta alrededor de la posición del nucleótido 473 hibrida con la porción de la SEQ ID Nº·17 que corresponde al primer segmento desde alrededor de la posición del

nucleótido 1 hasta alrededor de la posición del nucleótido 171, y el primer y tercer segmento son unidos por un segundo segmento de secuencia nucleotídica, el cual en este ejemplo está representado por la porción de la SEQ ID Nº 17 que corresponde al segundo segmento desde alrededor de la posición del nucleótido 172 hasta alrededor de la posición del nucleótido 302. La expresión de una secuencia nucleotídica correspondiente a la SEQ ID Nº 17 en células vegetales resulta en la síntesis de una molécula de ARN estabilizada Las células vegetales que transcriben la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº·17 en una secuencia de ARN pueden ser provistas en la dieta de un gusano de la raíz del maíz Un gusano de la raíz del maíz que se alimenta de células vegetales de ese tipo deja de alimentarse, se previene su desarrollo en un escarabajo adulto, se previene su alimentación, muere, o bien sufre de cualquiera o todos estos efectos como resultado de la inhibición de la síntesis de la proteína homóloga a CHD3.

Se utilizó la secuencia codificante de la β-tubulina derivada de una biblioteca de cADN de un gusano de la raíz del maíz para construir una secuencia nucleotídica que codifique un ARN doble cadena estabilizado Se utilizó una secuencia de cADN que se muestra en la SEQ ID Nº 18 que codifica una parte de un ortólogo o de un homólogo de la secuencia aminoacídica de una β-tubulina para construir un par de cebadores para ser utilizados en una reacción de amplificación térmica usando como molde al ADN genómico del gusano de la raíz del maíz El par de cebadores que se muestra en la SEQ ID Nº 19 y en la SEQ ID Nº·20 permitió la amplificación de un amplicón genómico doble cadena, una hebra del mismo exhibió la secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº 21 Se produjeron tres segmentos de secuencia nucleotídica a partir de la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº·21 Se produjo un primer segmento nucleotídico (SEQ ID Nº:173) utilizando la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº.21 como molde en una reacción

de amplificación térmica junto con el par de cebadores de amplificación térmica que exhibía las secuencias que se muestran en la SEQ ID Nº 22 y en la SEQ ID Nº 23. Se produjo un segundo segmento nucleotídico (SEQ ID Nº.27) utilizando una secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº:21 como molde en una reacción de amplificación térmica junto con el par de cebadores de amplificación térmica que exhibía las secuencias que se muestran en la SEQ ID Nº 25 y en la SEQ ID Nº:26 Se produjo un tercer segmento nucleotídico (SEQ ID Nº.36) utilizando una secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 21 como un molde en una reacción de amplificación térmica junto con el par de cebadores de amplificación térmica que exhibía las secuencias que se muestran en la SEQ ID Nº:28 y en la SEQ ID Nº.29 El extremo 3' de una de las hebras del primer segmento es complementario al extremo 3' de una de las hebras del segundo segmento de modo que en una reacción de amplificación térmica que contenga a ambos de estos segmentos, estos extremos complementarios hibriden y permitan una extensión mediada por la polimerasa de ambas hebras a partir de sus respectivos extremos 3' El extremo 3' de la otra hebra del segundo segmento es complementaria al extremo 3' de una de las hebras del tercer segmento, de modo que en una reacción de amplificación térmica que contenga a ambos de estos segmentos, estos extremos complementarios hibriden y permitan una extensión mediada por la polimerasa de ambas hebras a partir de sus respectivos extremos 3' En una reacción de amplificación térmica que contenga a los tres segmentos y a sus secuencias complementarias, esto es, el primero, el segundo y el tercer segmento, junto con las secuencias de los cebadores de amplificación térmica que se muestran en la SEQ ID Nº 22 y en la SEQ ID Nº 29, se produce una nueva secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº:31, que al ser colocada bajo el control de un promotor que funcione en plantas, puede producir una secuencia nucleotídica de ARN substancialmente idéntica a la secuencia que

se muestra en la SEQ ID Nº:31 excepto por la presencia de residuos de uridina en los lugares donde se encontraban presentes residuos de timidina Esta secuencia nucleotídica de ARN puede formarse en una molécula estabilizada de ARN en virtud de la complementariedad entre el tercer segmento y el primer segmento, en los cuales la porción de la SEQ ID Nº 31 que corresponde al tercer segmento desde alrededor de la posición del nucleótido 358 hasta alrededor de la posición del nucleótido 577 hibrida con la porción de la SEQ ID Nº 31 que corresponde al primer segmento desde alrededor de la posición del nucleótido 31 hasta alrededor de la posición del nucleótido 250, y el primer y tercer segmento son unidos por un segundo segmento de secuencia nucleotídica, el cual en este ejemplo está representado por la porción de la SEQ ID Nº:31 que corresponde al segundo segmento desde alrededor de la posición del nucleótido 251 hasta alrededor de la posición del nucleótido 357 La expresión de una secuencia nucleotídica correspondiente a la SEQ ID Nº 31 en células vegetales resulta en la síntesis de una molécula de ARN estabilizada. Las células vegetales que transcriben la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº 31 en una secuencia de ARN pueden ser provistas en la dieta de un gusano de la raíz del maíz Un gusano de la raíz del maíz que se alimenta de células vegetales de ese tipo deja de alimentarse, se previene su desarrollo en un escarabajo adulto, se previene su alimentación, muere, o bien sufre de cualquiera o todos estos efectos como resultado de la inhibición de la síntesis de la proteína β tubulina

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra los efectos sinérgicos de proveer en la dieta de una peste de un invertebrado una o más composiciones efectivas como pesticidas junto con una o más secuencias de ARN doble cadena derivadas del invertebrado que es peste, habiendo sido previamente demostrado el efecto

pesticida de las una o más secuencias de dsARN al ser provistas en la dieta de la peste.

Como se indicó en el Ejemplo 3, el proveer en la dieta de una peste de un invertebrado una molécula de ARN doble cadena derivada de esa peste resulta en la inhibición de una o más funciones biológicas de la peste y por lo tanto funciona para adquirir un efecto pesticida, resultando en la mortalidad de la peste o en alguna otra característica medible que reduce la habilidad de la peste para infestar un ambiente particular o un hospedador. La adición de uno o más agentes pesticidas diferentes, cada uno distinto del otro y cada uno funcionando para lograr su efecto pesticida mediante un medio diferente del modo en el que el dsARN funciona para lograr su efecto pesticida, puede resultar en el logro de un mejoramiento en el nivel de control de la peste y podría disminuir aún más la probabilidad de que la peste pueda desarrollar resistencia frente a uno o más de cualquiera de los agentes pesticidas o dsARN al ser usados solos para lograr una inhibición de la peste.

Para evaluar esto, se permite a las larvas del CRW alimentarse de la dieta dentro de la cual se han incorporado cantidades variables de una proteína Cry3Bb inhibitoria de los gusanos de la raíz del maíz y una cantidad fija de un ARN doble cadena formulado con anterioridad como se muestra en el Ejemplo 2 o en el 3, como por ejemplo un dsARN que corresponde a la SEQ ID Nº 17 o a la SEQ ID Nº 31 Se observa un efecto sinérgico de inhibición de la peste Como se muestra en el Ejemplo 2 y en el 3, una cantidad LD50 de una variante de Cry3Bb fue utilizada para lograr alrededor de un 50% de mortalidad de las larvas de insecto con una reducción coordinada en la aptitud de las larvas sobrevivientes, como puede ser juzgado mediante los reducidos pesos larvales en comparación con los controles negativos La reducción de la cantidad de la proteína insecticida en la dieta resulta en una reducción coordinada de la tasa de mortalidad, y en un aumento de los pesos medios de las larvas

sobrevivientes. La adición de dsARN correspondiente ya sea a la SEQ ID Nº:31 o a la SEQ ID Nº:17 resulta en una mortalidad casi completa con cada una de las concentraciones de Cry3Bb, y en una disminución substancial en los pesos medios de cualquier sobreviviente. Esto sugiere un efecto sinérgico La sinergia puede ser alcanzada a través del disturbio de las larvas en el intestino medio como un resultado de la introducción de cualquier cantidad de Cry3Bb, la que se ha mostrado que introduce poros en la membrana del intestino medio Los poros pueden permitir a un mayor nivel de las especies de ARN doble cadena permear dentro de las células o aún en la hemolinfa, resultando en un reparto más eficiente de las especies de dsARN dentro de las larvas, y por lo tanto resultando en una reducción más eficiente de la supresión del mARN blanco. Algunas combinaciones particulares de las composiciones formadoras de poros junto con composiciones de ARN doble cadena resultan en un efecto pesticida aumentado y sinérgico debido a que el dsARN es ahora más capaz de ser distribuido en toda la hemolinfa y ejercer efectos sobre células y tejidos remotos del intestino de la peste Las composiciones formadoras de poros particulares incluyen, pero pueden no estar limitadas a, las toxinas insecticidas proteicas derivadas de *B thuringiensis* y especies relacionadas, ya sea que éstas hayan sido o no demostradas como insecticidas para un insecto en particular, y aún pueden incluir, pero no estar limitadas a, los dominios formadores de poros de las toxinas de este tipo Las composiciones formadoras de poros de este tipo pueden también incluir a una o más de estas toxinas formadoras de poros o dominios o combinaciones de éstas, cada uno diferente del otro, exhibiendo cada uno un modo de acción diferente pudiéndose juzgar las propiedades para cada toxina o dominio formador de canal incluyendo la cinética de la formación del canal iónico, los tamaños y estados de conductancia, la conductancia total de la membrana, la especificidad iónica, y las propiedades de apertura del canal iónico. Las

combinaciones de dichas composiciones formadoras de poros junto con moléculas de dsARN específicas para la supresión de uno o más genes en una especie de coleóptero están específicamente contempladas en la presente

Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra que los fragmentos de la secuencia nucleotídica de la V-ATPasa, al ser provistos en la forma de ARN doble cadena en la dieta de una especie del CRW, son útiles para controlar al insecto que constituye la peste.

La secuencia que se muestra en la SEQ ID Nº:104 es un clon de cADN que representa a 1870 nucleótidos de un mARN de 2400 nucleótidos que codifica para una proteína que exhibe una identidad de secuencia substancial con una ATPasa Vacuolar de *Drosophila melanogaster* (68kd, subunidad 2) Este clon de cADN fue completamente secuenciado en ambas hebras utilizando cebadores diseñados a partir de la secuencia de datos inicial Estos cebadores de secuenciación se encuentran listados como SEQ ID Nº 105 hasta SEQ ID Nº:120 La SEQ ID Nº.121 y la SEQ ID Nº 122 son las secuencias de los cebadores usados para producir una copia de la SEQ ID Nº:104 a partir del cADN en el vector de clonación pSPORT (Invitrogen). Cada cebador contenía una secuencia promotora T7 de 20 nucleótidos, desde las posiciones de los nucleótidos 1 – 20 Los nucleótidos 21-44, que se muestran en la SEQ ID Nº 121 y los nucleótidos 21-45, que se muestran en la SEQ ID Nº:122, corresponden a las secuencias que flanquean al cADN insertado en el vector pSPORT. Estos cebadores permiten la amplificación de un molde de ADN que contiene el fragmento de cADN flanqueado en ambos extremos por promotores T7, que permiten la producción *in vitro* de un ARN doble cadena con una polimerasa T7 de ARN Cuando se incluyó el ARN doble cadena derivado a partir de la SEQ ID Nº:104 en la dieta del CRW, se observó alrededor de un 80% de mortalidad

Se evaluaron seis regiones diferentes de la SEQ ID Nº:104 mediante el uso de los siguientes conjuntos de cebadores de amplificación SEQ ID Nº·123 y SEQ ID Nº 124, que corresponden a los nucleótidos 1 a 291 (referido como sección #1, 271 pares de bases) de la SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 125 y SEQ ID Nº 126 que correponden a los nucleótidos 292 a 548 (referido como sección #2, 260 pares de bases); SEQ ID Nº·127 y SEQ ID Nº:128 que correponden a los nucleótidos 549 a 830 (referido como sección #3, 271 pares de bases) , SEQ ID Nº 129 y SEQ ID Nº 130 que correponden a los nucleótidos 840 a 1345 (referido como sección #4, 505 pares de bases) , SEQ ID Nº 131 y SEQ ID Nº.132 que correponden a los nucleótidos 1360 a 1621 (referido como sección #5 261 pares de bases), SEQ ID Nº 133 y SEQ ID Nº·136 que correponden a los nucleótidos 1540 a1870 (referido como sección #6, 278 pares de bases) Nótese que la sección 5 y la 6 se superponen por aproximadamente 80 pares de bases Cuando estas 6 secciones fueron incorporadas en la dieta del CRW de forma separada, las secciones #1, #2, #3 y #4 mostraron una mortalidad del CRW en el rango que va desde el 94% hasta el 100% La sección #5 y la #6 no mostraron mortalidad de CRW sobre el fondo observado en los controles no tratados La secuencia representada por la sección #1 fue subdividida aún más en 3 secciones más pequeñas, estando representada cada una de estas secciones más pequeñas por al menos desde alrededor de 150 a alrededor de 180 nucleótidos contiguos dentro de la sección #1, de modo que la primer subsección en la sección #1 se superpone con la segunda subsección en la sección #1, y la tercera subsección en la sección #1 se superpone con la segunda subsección. Cada una de estas subsecciones fue evaluada de forma separada en el bioensayo del CRW. Se observó una mortalidad de entre el 80 y el 90% usando estas tres secuencias más cortas.

Un segundo medio de evaluar la bioactividad de las moléculas de dsARN derivadas de genes del CRW es construir una molécula de ARN

autocomplementaria. Mediante la combinación de las mismas secuencias de ADN en la orientación reversa con el promotor de la polimerasa T7 de ARN, puede sintetizarse una molécula única que sea autocomplementaria Se construyó una molécula de ARN de este tipo mediante la combinación de los nucleótidos 1 hasta 345 con los 50 hasta 325, de la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID Nº:104. La secuencia resultante es como la que se muestra en la SEQ ID Nº 137 y fue designada como pIC17527. pIC17527 fue clonada en el pTOPT2.1 (Invitrogen). Usando el promotor T7 que se encuentra en el vector pTOPO 2.1 se produjo un dsARN de aproximadamente 500 pares de bases de nucleótidos y se incorporó en la dieta del CRW La mortalidad resultante fue entre el 80% y el 100%.

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la toxicidad oral de los dsARN hacia las larvas del escarabajo de la papa del Colorado, *Leptinotarsa decemlineata.*

Se aisló el ARN total a partir de las larvas del escarabajo de la papa de Colorado (CPB), *Leptinotarsa decemlineata* utilizando el conjunto de elementos Ambion *mir*Vana (Catálogo # 1560) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX). Se utilizaron las larvas del CPB que ocupaban aproximadamente un volumen de 200 µL en un tubo de micro centrífuga para cada preparación Se utilizaron cinco microgramos de ARN total para preparar el cADN usando el sistema de RT-PCR, Invitrogen Thermoscript™ (Catálogo # 11146) y los procedimientos recomendados para la síntesis de cADN mediada por cebadores al azar (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este cADN fue usado como molde para la amplificación de las secuencias ortólogas de la subunidad A2 de la V-ATPasa usando la Taq polimerasa de ADN y los oligonucleótidos cebadores pr 550 (SEQ ID Nº·160) y pr552 (SEQ ID Nº 161) Estos cebadores fueron diseñados por alineación de las secuencias nucleotídicas para los ortólogos más cercanos de la V-ATPasa A de *Manduca sexta* (SEQ ID Nº 151),

Aedes aegypti (SEQ ID Nº 152), *Drosophila melanogaster* (SEQ ID Nº:153), y *Diabrotica virgifera* (WCR) y mediante la selección regiones de degeneración mínima. El cebador pr550 corresponde a los nucleótidos 230-252 en la secuencia génica de *M sexta* mientras que el cebador pr552 corresponde a los nucleótidos 1354-1331 en la secuencia génica de *M sexta*.

La amplificación se logró usando un procedimiento de amplificación de descenso con los siguientes parámetros de ciclado.

Paso 1 94 ºC, 2 min,

Paso 2 94 ºC, 30 seg;

Paso 3 50 ºC, 2 min,

Paso 4 72 ºC, 2 min

(35 ciclos para los pasos 2-4, con una disminución en –0,3 ºC por ciclo para el paso 3),

Paso 5. 72 ºC, 10 min, y

Paso 6. 4 ºC.

El fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kb amplificado a partir del cADN fue clonado en el vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) para dar lugar al plásmido recombinante pIC17105 La secuencia nucleotídica del inserto clonado (SEQ ID Nº:144) comparte sólo un 82% de identidad de secuencia nucleotídica con la secuencia del ortólogo de la subunidad A2 de la V-ATPasa del gusano de la raíz del maíz del Oeste, *Diabrotica virgifera*, sin embargo, las secuencias aminoacídicas deducidas para las proteínas V-ATPasa A codificadas comparten un 97% de identidad de secuencia

La secuencia ortóloga de la V-ATPasa A presente en el plásmido pIC17105 fue amplificada usando los cebadores pr568 (SEQ ID Nº 162) y pr569 (SEQ ID Nº:163), diseñados como cebadores "universales" para generar moldes de ADN con secuencias promotoras para la polimerasa T7 a partir de los clones del pCR2 1-TOPO. El ADN amplificado sirvió como el molde para la

síntesis de dsARN usando el conjunto de elementos Ambion MEGAscript™ (Catálogo # 1626) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc , Austin, TX). Se alimentó a las larvas de *L decemlineata* con los dsARN purificados derivados de la secuencia ortóloga de la V-ATPasa A de *L decemlineata* en un ensayo de alimentación de insectos.

- La dieta del CPB consiste en 13,2 g/L de agar (Serva 11393), 140,3 g/L de la premezcla Bio-Serve (F9380B), 5ml/L de KOH (18.3% p/p), y 1,25 ml/L de formalina (37%). La dieta fue dispensada en alícuotas de 200 (L dentro de placas de 96pocillos y secada brevemente de forma previa a la aplicación de la muestra Se aplicaron veinte (L de la muestra de prueba por pocillo, con agua estéril sirviendo como el control de seguridad no tratado (CNT) Se dejaron secar las placas antes de agregar a las larvas de insecto. Se agregó una larva neonata del CPB por pocillo con un pincel fino Se sellaron las placas con Mylar y se ventilaron usando un broche para insectos Se evaluaron cuarenta larvas por tratamiento Las placas del bioensayo fueron incubadas a 27 °C, 60% RH, en oscuridad completa durante 10 – 12 días Se les dio un puntaje a las placas en cuanto a la atrofia y la mortalidad de las larvas Se analizaron los datos usando el programa estadístico JMP□ 4 (SAS Institute, Cary, N C , USA) ----------

Tabla 2. Toxicidad oral del dsARN para larvas de CPB

Tratamiento	% Mortalidad	Desvío Estándar	SEM	95% CI
Control de seguridad no tratado	8,33	10,21	4,17	-2,38-19,04
dsARN de la V-ATPasa A	87,5	10,83	3,61	79,18-95,82

Sobre la base de los datos del bioensayo de toxicidad oral usando un dsARN específico para la V-ATPasa del CPB, la infestación de las plantas por el CPB puede ser controlada mediante la provisión en la dieta de la peste, una

célula vegetal que exprese una o más secuencias de dsARN específicas para la supresión de uno o más genes del CPB, que constituye una peste.

Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra los resultados de los bioensayos de varias larvas de lepidópteros sobre dietas artificiales usando dsARN insecto específicos

Se aisló el ARN total de larvas de 2do-3er instar de *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon*, y *Ostrinia nubilalis* usando el conjunto de elementos Ambion *mir*Vana (Catálogo # 1560) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc , Austin, TX) Se utilizaron las larvas que ocupaban aproximadamente un volumen de 200 µL en un tubo de micro centrífuga para cada preparación.

Se utilizaron cinco microgramos del ARN total de cada una de las especies de lepidópteros mencionados con anterioridad para preparar cADN usando el sistema de RT-PCR Invitrogen Thermoscript™ (Catálogo # 11146) y los procedimientos recomendados para la síntesis de cADN mediada por cebadores al azar (Invitrogen, Carlsbad, CA) Este cADN fue utilizado como un molde para la amplificación de una o más secuencias ortólogas de la subunidad A2 de la V-ATPasa específicas para cada una de las especies de lepidópteros usando la Taq polimerasa de ADN y los oligonucleótidos cebadores pr 550 (SEQ ID Nº 160) y pr552 (SEQ ID Nº 161)

Estos cebadores fueron diseñados mediante el alineamiento de las secuencias nucleotídicas para los ortólogos más cercanos de la V-ATPasa A de *Manduca sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, y *Diabrotica virgifera* (WCR) y a través de la selección de regiones de degeneración mínima El cebador pr550 corresponde a los nucleótidos 230-252 en la secuencia génica de *M sexta* mientras que el cebador pr552 corresponde a los nucleótidos 1354-1331 en la secuencia genética de *M. sexta*

La amplificación fue llevada a cabo utilizando un procedimiento de PCR de descenso con los parámetros de ciclado del mismo modo en que fueron descriptos en el Ejemplo 6 Los productos de ADN amplificados fueron clonados en el pCR2.1-TOPO y secuenciados para confirmar su identidad Los plásmidos recombinantes que contienen las secuencias de los genes ortólogos se listan en la Tabla 3

Tabla 3. Secuencias ortólogas de la subunidad A2 de la V-ATPasa de lepidópteros

Plásmido	Especie de Insecto	SEQ ID Nº
pIC17088	*Spodoptera frugiperda*	SEQ ID Nº 145
pIC17101	*Agrotis ipsilon*	SEQ ID Nº 146
pIC17102	*Helicoverpa zea*	SEQ ID Nº.147
pIC17103	*Ostrinia nubilalis*	SEQ ID Nº 148

Las secuencias ortólogas de la V-ATPasa A dentro de los plásmidos pIC17088, pIC17101 y pIC17102 fueron amplificadas usando los cebadores pr555 (SEQ ID Nº 164) y pr556 (SEQ ID Nº 165), diseñados para generar fragmentos de ADN con promotores para la polimerasa T7 flanqueantes y opuestos para la síntesis *in vitro* de dsARN

Se sintetizaron ARNs doble cadena (dsARN) para las secuencias ortólogas de FAW, BCW, y CEW a partir de estos moldes de ADN amplificado usando el conjunto de elementos de Ambion MEGAscript™ (Catálogo # 1626) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc , Austin, TX) y se sometieron a bioensayos de insectos en 10 ppm

Para estos ensayos, se preparó una dieta artificial para lepidópteros (165 g/L de la Dieta de Southland para Múltiples Especies, 14,48 g/L de agar) y se dispensaron 500µl por pocillo en 128 bandejas de pocillos Se dispensaron las muestras sobre la dieta y se colocaron en una cámara "de secado" a 27 °C

y 35% de humedad, donde el exceso de agua es evaporado Una vez seco, cada pocillo fue infestado con una única larva neonata y sellado con un sello Mylar perforado Las bandejas fueron incubadas durante seis a ocho días a 27 °C Los insectos control no tratados agotaron toda la dieta de sus respectivos pocillos en seis a ocho días Se prepararon bandejas de cincuenta pocillos con 4 ml de dieta artificial por pocillo, y todos los insectos que se encontraban en o cerca del agotamiento de la dieta fueron transferidos a las nuevas bandejas antes de que el ensayo concluyera Estas bandejas fueron selladas y devueltas al incubador, y entonces todos los bioensayos fueron evaluados luego de un total de diez a doce días

Los resultados de estos bioensayos para las especies de insectos lepidópteros indican que no hay ningún efecto significativo sobre la mortalidad de las larvas o la ganancia de masa al ser comparados con el control de seguridad no tratado (las comparaciones para todos los pares se realizaron usando el Tukey-Kramer HSD) y utilizando este régimen de ensayo se ha observado. Tampoco se observaron efectos sobre la mortalidad de las larvas o en la ganancia de masa en bioensayos, usando combinaciones de dsARN y cantidades subletales de proteínas insecticidas formadoras de poros BT que, a partir de experimentos previos, se conoce que son tóxicas para estas pestes de lepidópteros

Ejemplo 8

Este ejemplo ilustra un bioensayo para la determinación de la toxicidad oral del dsARN hacia las larvas del picudo del algodonero, *Anthonomus grandis*.

Se aisló el ARN total de larvas del picudo del algodonero (BWV), *Anthonomus grandis*, usando el conjunto de elementos Ambion *mir*Vana (Catálogo # 1560) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc , Austin, TX) Se utilizaron las larvas del BWV que ocupaban aproximadamente un

volumen de 200 µL en un tubo de micro centrífuga para cada preparación Se utilizaron cinco micrógramos del ARN total para preparar cADN usando el sistema de RT-PCR Invitrogen Thermoscript™ (Catálogo # 11146) y los procedimientos recomendados para la síntesis de cADN mediada por cebadores al azar (Invitrogen, Carlsbad, CA) Este cADN fue utilizado como un molde para la amplificación de las secuencias ortólogas de la subunidad A2 de la V-ATPasa usando la Taq polimerasa de ADN y los oligonucleótidos cebadores pr 550 (SEQ ID Nº 160) y pr552 (SEQ ID Nº:161)

Estos cebadores fueron diseñados mediante el alineamiento de las secuencias nucleotídicas para los ortólogos más cercanos de la V-ATPasa A de *Manduca sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, y *Diabrotica virgifera* (WCR) y a través de la selección de regiones de degeneración mínima El cebador pr550 corresponde a los nucleótidos 230-252 en la secuencia génica de *M sexta* mientras que el cebador pr552 corresponde a los nucleótidos 1354-1331 en la secuencia genética de *M sexta*

La amplificación fue llevada a cabo utilizando un procedimiento de PCR de descenso con los parámetros de ciclado del mismo modo en que fueron descriptos en el Ejemplo 6. El fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 1,2 kb a partir del cADN fue clonado en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y el inserto fue secuenciado para obtener confirmación La secuencia ortóloga de la V-ATPasa A (SEQ ID NO·149) fue amplificada usando los cebadores pr568 (SEQ ID NO·162) y pr569 (SEQ ID NO:163), diseñados como cebadores "universales" para generar moldes de ADN con secuencias promotoras para la polimerasa T7 flanqueantes, a partir de los clones de pCR2 1-TOPO

Se sintetizaron ARNs doble cadena (dsARN) a partir de este molde de ADN amplificado usando el conjunto de elementos de Ambion MEGAscript™

(Catálogo # 1626) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc , Austin, TX) y se sometieron al bioensayo de insectos

Para los bioensayos del picudo del algodonero, *Anthonomus grandis* Boheman, se utilizó una dieta artificial para insectos basada en el agar (Bioserv™ - F9247B; Gast y Davich, 1966) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se dispensaron aproximadamente 200µl de dieta fundida en placas de micro titulación de 96 pocillos y se las dejó enfriarse y solidificar Una muestra (20µl) que contenía alrededor de 10 ppm de dsARN que correspondía a la secuencia ortóloga de la V-ATPasa A (SEQ ID N°.149) fue entonces utilizada para recubrir la dieta y dejada secar. Luego se dispensaron sobre la dieta huevos de Insecto (0-14) en 25 µl de agar 0,1%. Las placas fueron selladas a continuación con sellos perforados (Zymark #72281). El ensayo fue incubado a 27 °C durante diez a doce días y se le otorgó un puntaje teniendo en cuenta la actividad, mediante la determinación de acumulación de las deyecciones del insecto. No se observaron efectos sobre la mortalidad de las larvas o en la ganancia de masa, pero esto puede ser un resultado de la fisiología particular de la alimentación del picudo del algodonero. El hurgar en la dieta puede disminuir significativamente la dosis de dsARN ingerido y por lo tanto reducir significativamente cualquier efecto que de otro modo sería observado con una fisiología de alimentación de superficie. La incorporación del dsARN dentro de la dieta de una manera uniforme podría probablemente lograr una mortalidad significativa y una reducida ganancia de masa

Otras secuencias génicas blanco del picudo del algodonero pueden ser clonadas y utilizadas como moldes para la síntesis *in vitro* de dsARN que puede entonces ser evaluado en bioensayos de insectos para determinar su eficacia. Por ejemplo, el gen de la proteína ribosomal L19 (*rpl19*) puede ser utilizado como un molde para la síntesis de dsARN Las secuencias nucleotídicas para los ortólogos de *rpl19* de *Bombyx mori* (SEQ ID N° 154),

Drosophila melanogaster (SEQ ID Nº 155), *Anopholes gambiae* (SEQ ID Nº 156), y *Diabrotica virgifera* (SEQ ID Nº 157) fueron alineadas y se identificaron las regiones consenso con degeneración mínima con el propósito de diseñar oligonucleótidos cebadores degenerados Los cebadores pr574 (SEQ ID Nº.166) y pr577 (SEQ ID Nº.168) o bien los cebadores pr575 (SEQ ID Nº 167) y pr577 (SEQ ID Nº 168) pueden ser utilizados para amplificar supuestas secuencias ortólogas de rpl19 a partir de muchas especies de insectos diferentes

La amplificación es alcanzada usando un procedimiento de amplificación de descenso junto con los parámetros de ciclado que fueron descriptos en el Ejemplo 6. El fragmento de ADN de aproximadamente 0,4 kb amplificado a partir del cADN del picudo del algodonero fue clonado dentro del vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) y el inserto se secuenció para obtener una confirmación La secuencia ortóloga de *rpl19* (SEQ ID Nº 158) fue amplificada utilizando los cebadores pr568 (SEQ ID Nº.162) y pr569 (SEQ ID Nº 163), diseñados como cebadores "universales" para generar moldes de ADN con secuencias promotoras flanqueantes para la polimerasa T7 a partir de clones de pCR2.1-TOPO

Ejemplo 9

Este ejemplo ilustra un bioensayo para la determinación dé la toxicidad oral de los dsARN hacia las larvas del gorgojo castaño de la harina, *Tribolium castaneum.*

Algunas pestes de insectos son comercialmente importantes debido a que infestan a los productos comerciales y materiales procesados producidos a partir de un cultivo en particular Una peste particular de ese tipo es el gorgojo castaño de la harina La presencia de una o más especies de dsARN específicos para la inhibición de uno o más genes de dichas pestes que se encuentran en el producto comercial y materiales procesados producidos a

partir de un cultivo en particular sería útil en el control de una infestación de este tipo por la peste

Se aisló el ARN total del larvas del gorgojo castaño de la harina (RFB), *Tribolium castaneum*, usando el conjunto de elementos Ambion *mir*Vana (Catálogo # 1560) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX). Se utilizaron las larvas del RFB que ocupaban aproximadamente un volumen de 200 µL en un tubo de micro centrífuga para cada preparación Se utilizaron cinco microgramos del ARN total para preparar cADN usando el sistema de RT-PCR Invitrogen Thermoscript™ (Catálogo # 11146) y los procedimientos recomendados para la síntesis de cADN mediada por cebadores al azar (Invitrogen, Carlsbad, CA) Este cADN fue utilizado como un molde para la amplificación de las secuencias ortólogas de la subunidad A2 de la V-ATPasa usando la Taq polimerasa de ADN y los oligonucleótidos cebadores pr 550 (SEQ ID Nº·160) y pr552 (SEQ ID Nº·161)

Estos cebadores fueron diseñados mediante el alineamiento de las secuencias nucleotídicas para los ortólogos más cercanos de la V-ATPasa A de *Manduca sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, y *Diabrotica virgifera* (WCR) y la selección de regiones de degeneración mínima El cebador pr550 corresponde a los nucleótidos 230-252 en la secuencia génica de *M sexta* mientras que el cebador pr552 corresponde a los nucleótidos 1354-1331 en la secuencia genética de *M. sexta*.

La amplificación fue llevada a cabo utilizando un procedimiento de PCR de descenso con los parámetros de ciclado del mismo modo en que fueron descriptos en el Ejemplo 6 El fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 1,2 kb a partir del cADN fue clonado en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y el inserto fue secuenciado para obtener confirmación La secuencia ortóloga de la V-ATPasa A (SEQ ID NO 150) fue amplificada usando los cebadores pr568 (SEQ ID NO 162) y pr569 (SEQ ID NO 163), diseñados

como cebadores "universales" para generar moldes de ADN con secuencias promotoras para la polimerasa T7 flanqueantes a partir de los clones de pCR2.1-TOPO

Se sintetizaron ARNs doble cadena (dsARN) a partir de este molde de ADN amplificado usando el conjunto de elementos de Ambion MEGAscript™ (Catálogo # 1626) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc , Austin, TX) y se sometieron al bioensayo de insectos. La harina de trigo es mezclada uniformemente con agua y con el dsARN correspondiente a la secuencia ortóloga de la V-ATPasa A (SEQ ID NO 150), y se la deja secar La composición es utilizada como un sustrato para un bioensayo junto con larvas del gorgojo castaño de la harina Se observan efectos insecticidas luego de algunos días de incubación mediante la extracción de las larvas del gorgojo de la mezcla de harina y dsARN

Otras secuencias génicas blanco del gorgojo castaño de la harina pueden ser clonadas y utilizadas como moldes para la síntesis *in vitro* de dsARN que puede entonces ser evaluado en bioensayos de insectos para determinar su eficacia. Por ejemplo, el gen de la proteína ribosomal L19 (*rpl19*) puede ser utilizado como un molde para la síntesis de dsARN. Las secuencias nucleotídicas para los ortólogos de *rpl19* de *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster, Anopholes gambiae,* y *Diabrotica virgifera* fueron alineadas y se identificaron las regiones consenso que presentaban degeneración mínima con el propósito de diseñar oligonucleótidos cebadores degenerados Los cebadores pr574 (SEQ ID Nº.166) y pr577 (SEQ ID Nº:168) o bien los cebadores pr575 (SEQ ID Nº 167) y pr577 (SEQ ID Nº.168) pueden ser utilizados para amplificar supuestas secuencias ortólogas de rpl19 a partir de muchas especies de insectos diferentes

La amplificación es alcanzada usando un procedimiento de amplificación de descenso junto con los parámetros de ciclado que fueron descriptos en el

Ejemplo 6 El fragmento de ADN de aproximadamente 0,4 kb amplificado a partir del cADN del gorgojo castaño de la harina fue clonado dentro del vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) y el inserto se secuenció para obtener una confirmación La secuencia ortóloga de *rpl19* (SEQ ID Nº:159) fue amplificada utilizando los cebadores pr568 (SEQ ID Nº 162) y pr569 (SEQ ID Nº.163), diseñados como cebadores "universales" para generar moldes de ADN con secuencias promotoras flanqueantes para la polimerasa T7 a partir de clones de pCR2.1-TOPO

Ejemplo 10

Este ejemplo ilustra un bioensayo para la determinación de la toxicidad oral de los dsARN hacia las larvas blancas y los gusanos de alambre

Se aisla el ARN total de las larvas blancas de las larvas de los gusanos de alambre usando el conjunto de elementos Ambion *mir*Vana (Catálogo # 1560) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc , Austin, TX) Se utilizan las larvas que ocupan aproximadamente un volumen de 200 µL en un tubo de micro centrífuga para cada preparación. Se utilizan cinco microgramos del ARN total para preparar cADN usando el sistema de RT-PCR Invitrogen Thermoscript™ (Catálogo # 11146) y los procedimientos recomendados para la síntesis de cADN mediada por cebadores al azar (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este cADN es utilizado como un molde para la amplificación de las secuencias ortólogas de la subunidad A2 de la V-ATPasa usando la Taq polimerasa de ADN y los oligonucleótidos cebadores pr 550 (SEQ ID Nº:160) y pr552 (SEQ ID Nº:161)

Estos cebadores fueron diseñados mediante el alineamiento de las secuencias nucleotídicas para los ortólogos más cercanos de la V-ATPasa A de *Manduca sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, y *Diabrotica virgifera* (WCR) y a través de la selección de regiones de degeneración mínima El cebador pr550 corresponde a los nucleótidos 230-252 de la

secuencia génica de *M sexta* mientras que el cebador pr552 corresponde a los nucleótidos 1354-1331 de la secuencia génica de *M. sexta*.

La amplificación es llevada a cabo utilizando un procedimiento de PCR de descenso con los parámetros de ciclado del mismo modo en que fueron descriptos en el Ejemplo 7 El fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 1,2 kb a partir del cADN es clonado en el vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) y el inserto es secuenciado para obtener confirmación La secuencia ortóloga de la V-ATPasa A es amplificada usando los cebadores pr568 (SEQ ID NO:162) y pr569 (SEQ ID NO.163), diseñados como cebadores "universales" para generar moldes de ADN con secuencias promotoras para la polimerasa T7 flanqueantes a partir de los clones de pCR2 1-TOPO

Se sintetizan ARNs doble cadena (dsARN) a partir de este molde de ADN amplificado usando el conjunto de elementos de Ambion MEGAscript™ (Catálogo # 1626) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX) y se someten al bioensayo de insectos

Otras secuencias génicas blanco de las larvas blancas o de los gusanos de alambre pueden ser clonadas y utilizadas como moldes para la síntesis *in vitro* de dsARN que puede entonces ser evaluado en bioensayos de insectos para determinar su eficacia. Por ejemplo, el gen de la proteína ribosomal L19 (*rpl19*) puede ser utilizado como un molde para la síntesis de dsARN. Las secuencias nucleotídicas para los ortólogos de *rpl19* de *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Anopholes gambiae*, y *Diabrotica virgifera* fueron alineadas y se identificaron las regiones consenso con degeneración mínima con el propósito de diseñar oligonucleótidos cebadores degenerados Los cebadores pr574 y pr577 o bien los cebadores pr575 y pr577 pueden ser utilizados para amplificar supuestas secuencias ortólogas de rpl19 a partir de muchas especies de insectos diferentes

La amplificación es alcanzada usando un procedimiento de amplificación de descenso junto con los parámetros de ciclado que fueron descriptos en el Ejemplo 7 El fragmento de ADN de aproximadamente 0,4 kb amplificado a partir del cADN es clonado dentro del vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y el inserto es secuenciado para obtener una confirmación. La secuencia ortóloga de *rpl19* es amplificada utilizando los cebadores pr568 (SEQ ID Nº 162) y pr569 (SEQ ID Nº.163), diseñados como cebadores "universales" para generar moldes de ADN con secuencias promotoras flanqueantes para la polimerasa T7 a partir de clones de pCR2 1-TOPO.

Ejemplo 11

Este ejemplo ilustra un bioensayo para la determinación de la toxicidad oral de los dsARN hacia las larvas de mosquito, *Aedes aegypti.*

Se aisló el ARN total de larvas de larvas de *Aedes aegypti* usando el conjunto de elementos Ambion *mir*Vana (Catálogo # 1560) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc , Austin, TX) Se utilizan las larvas de *Aedes aegypti* que ocupan aproximadamente un volumen de 200 µL en un tubo de micro centrífuga para cada preparación Se utilizan cinco microgramos del ARN total para preparar cADN usando el sistema de RT-PCR Invitrogen Thermoscript™ (Catálogo # 11146) y los procedimientos recomendados para la síntesis de cADN mediada por cebadores al azar (Invitrogen, Carlsbad, CA) Este cADN es utilizado como un molde para la amplificación de las secuencias ortólogas de la subunidad A2 de la V-ATPasa usando la Taq polimerasa de ADN y los oligonucleótidos cebadores pr 550 (SEQ ID Nº 160) y pr552 (SEQ ID Nº·161)

Estos cebadores fueron diseñados mediante el alineamiento de las secuencias nucleotídicas para los ortólogos más cercanos de la V-ATPasa A de *Manduca sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, y *Diabrotica virgifera* (WCR) y a través de la selección de regiones de degeneración

mínima El cebador pr550 corresponde a los nucleótidos 230-252 de la secuencia génica de *M sexta* mientras que el cebador pr552 corresponde a los nucleótidos 1354-1331 de la secuencia génica de *M. sexta*.

La amplificación es llevada a cabo utilizando un procedimiento de PCR de descenso con los parámetros de ciclado del mismo modo en que fueron descriptos en el Ejemplo 7 El fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 1,2 kb a partir del cADN es clonado en el vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) y el inserto es secuenciado para obtener confirmación. La secuencia ortóloga de la V-ATPasa A es amplificada usando los cebadores pr568 (SEQ ID NO·162) y pr569 (SEQ ID NO 163), diseñados como cebadores "universales" para generar moldes de ADN con secuencias promotoras para la polimerasa T7 flanqueantes a partir de los clones de pCR2 1-TOPO

Se sintetizan ARNs doble cadena (dsARN) a partir de este molde de ADN amplificado usando el conjunto de elementos de Ambion MEGAscript™ (Catálogo # 1626) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX) y se someten al bioensayo de insectos

Otras secuencias génicas blanco de los mosquitos pueden ser clonadas y utilizadas como moldes para la síntesis *in vitro* de dsARN que puede entonces ser evaluado en bioensayos de insectos para determinar su eficacia. Por ejemplo, el gen de la proteína ribosomal L19 (*rpl19*) puede ser utilizado como un molde para la síntesis de dsARN Las secuencias nucleotídicas para los ortólogos de *rpl19* de *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Anopholes gambiae*, y *Diabrotica virgifera* fueron alineadas y se identificaron las regiones consenso con degeneración mínima con el propósito de diseñar oligonucleótidos cebadores degenerados. Los cebadores pr574 y pr577 o bien los cebadores pr575 y pr577 pueden ser utilizados para amplificar supuestas secuencias ortólogas de rpl19 a partir de muchas especies de insectos diferentes

La amplificación es alcanzada usando un procedimiento de amplificación de descenso junto con los parámetros de ciclado que fueron descriptos en el Ejemplo 7. El fragmento de ADN de aproximadamente 0,4 kb amplificado a partir del cADN es clonado dentro del vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y el inserto es secuenciado para obtener una confirmación. La secuencia ortóloga de *rpl19* es amplificada utilizando los cebadores pr568 (SEQ ID Nº 162) y pr569 (SEQ ID Nº 163), diseñados como cebadores "universales" para generar moldes de ADN con secuencias promotoras flanqueantes para la polimerasa T7 a partir de clones de pCR2 1-TOPO.

Se sintetizan los ARN doble cadena (dsARN) a partir de este molde de ADN amplificado usando el conjunto de elementos Ambion MEGAscript™ (Catálogo # 1626) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc , Austin, TX) y se someten al bioensayo de insectos

Se contemplan otras especies de mosquitos dentro del alcance de esta invención Las secuencias génicas apropiadas como blanco de las especies de *Aedes*, *Culex*, y *Anopholes* pueden ser amplificadas usando oligonucleótidos cebadores apropiados, clonados dentro del vector pCR2 1-TOPO (Invitrogen) y el inserto puede ser secuenciado para obtener confirmación Las secuencias blanco clonadas son amplificadas usando los cebadores pr568 (SEQ ID Nº.162) y pr569 (SEQ ID Nº 163), diseñados como cebadores "universales" para generar moldes de ADN con secuencias promotoras para la polimerasa T7 a partir de los clones del pCR2 1-TOPO

Se sintetizan ARNs doble cadena (dsARN) a partir de estos moldes de ADN amplificado usando el conjunto de elementos de Ambion MEGAscript™ (Catálogo # 1626) y los procedimientos recomendados (Ambion Inc , Austin, TX) y se someten al bioensayo de insectos.

Ejemplo 12

Este ejemplo ilustra cómo el dsARN hecho a partir de la región 3'UTR de la V-ATPasa mostró la regulación río abajo del blanco

Los segmentos (dsARN de 300 pb aproximadamente) de la V-ATPasa 3' UTR del WCR han sido puestos en el bioensayo del WCR y han fallado en mostrar atrofia y mortalidad dentro de un período de 12 días de bioensayo Los segmentos de tamaños comparables que se encuentran dentro de la región codificante de la V-ATPasa sí muestran atrofia y mortalidad significativas en un rango de concentraciones Las transferencias Northern que examinaban el ARN total extraído de larvas del WCR alimentadas durante 4 días con un segmento 3' UTR de la V-ATPasa (y sondeada con una sonda de la región codificante) mostraron una declinación significativa en el mARN de la V-ATPasa blanco en relación con las larvas del control no tratado (resumido en NBP#7497215). Sin embargo, el mensaje detectable permaneció, indicando un noqueado (*knock-down*) menos efectivo del blanco con un segmento 3' UTR de dsARN (versus usando un segmento de una región codificante) y/o una contribución de un segundo gen supuesto de la V-ATPasa que tiene 3' UTR significativamente divergente del gen de la V-ATPasa primario Los datos de la transferencia Southern sobre el WCR son consistentes con más de una secuencia génica perteneciente al genoma, que hibrida, pero el examen de los ESTs y la PCR de familia limitada (*limited family PCR*) no han demostrado todavía que un supuesto segundo gen sea transcripto.

Es importante mencionar que a pesar de que es crítico determinar el potencial para atrofiar y matar larvas, un simple monitoreo de la expresión de un gen blanco por una transferencia Northern o una PCR cuantitativa podría también encontrar blancos favorables para las estrategias del iARN Los resultados precedentes más otros experimentos de Northern que se refieren al blanco de la V-ATPasa han mostrado que el efecto sobre la abundancia del

transcripto es discernible en insectos dentro de un período de horas desde la presentación del dsARN

Ejemplo 13

Este ejemplo ilustra una aproximación a la implementación de la supresión génica de las pestes constituidas por insectos usando un método de silenciamiento mediado por ta-siARN

Un método alternativo para silenciar genes en una peste de plantas utiliza a la recientemente descubierta clase de ARN pequeño de interferencia de acción en *trans* (ta-siARN) (Dalmay *et al.*, Cell 101:543-553, 2000; Mourrain *et al*, Cell 101 533-542, 2000, Peragine *et al*, Genes and Development, 18:2368–2379, 2004, Vazquez *et al*, Mol Cell 16(1) 69-79, 2004, Yu *et al*, Mol Plant Microbe Interact 16:206-216, 2003) Los ta-siARN son derivados a partir de transcriptos de ARN de una única hebra que son blanco de los miARN que ocurren naturalmente en la célula. Los métodos para el uso de microARN para gatillar a los ta-siARN para lograr el silenciamiento génico en plantas se describen en la Solicitud de Patente Provisional de EE UU Nº 60/643,136 (Carrington et al 2004), y son incorporados en la presente como una referencia en su totalidad Se identificó al menos un miARN peste específico, expresado en las células epiteliales del intestino de las larvas de los gusanos de la raíz del maíz. Este miARN peste específico es usado a continuación para identificar al menos una secuencia blanco de ARN transcripta, complementaria al miARN que es expresado en la célula La secuencia blanco correspondiente es una secuencia corta de no más de 21 nucleótidos contiguos que, cuando son parte de un transcripto de ARN y son contactadas por su miARN correspondiente en un tipo celular con una senda de iARN funcional, lleva a una escisión mediada por una máquina de cortar de dicho transcripto. Una vez que se han identificado las secuencias blanco del miARN, al menos una secuencia blanco de miARN es fusionada a una segunda secuencia que corresponde a parte de

un gen de la peste que será silenciado usando este método Por ejemplo, La(s) secuencia(s) blanco de miARN es fusionada a las secuencias vacuolares del gen de la ATPasa vacuolar (V-ATPasa) del gusano de la raíz del maíz La secuencia blanco del miARN puede ser colocada en el extremo 5', en el extremo 3', o embebida en el medio del gen de la V-ATPasa. Puede que sea preferible el usar múltiples secuencias blanco del miARN correspondientes a múltiples genes de miARN, o el utilizar la misma secuencia blanco del miARN múltiples veces en la quimera de la secuencia blanco del miARN y la secuencia de la V-ATPasa. La secuencia de la V-ATPasa puede ser de cualquier largo, con un mínimo de 21 pb.

La quimera de la(s) secuencia(s) del miRNA blanco y la secuencia de la V-ATPasa se expresa en células vegetales usando cualquiera de un número de promotores apropiados y otros elementos regulatorios de la transcripción, siempre y cuando la transcripción ocurra en los tipos celulares sujetos a la provisión de la dieta de la peste, por ejemplo las raíces del maíz para el control del gusano de la raíz del maíz

Este método puede tener la ventaja adicional de entregar moléculas de ARN más largas a la peste blanco Típicamente, los dsARN's producidos en plantas son rápidamente procesados por Dicer en ARN's cortos que pueden no ser efectivos cuando son dados como alimento de forma exógena a algunas pestes En este método, se produce un transcripto de una única hebra en la célula vegetal, éste es tomado por la peste y convertido en un dsARN en la célula de la peste donde es entonces procesado en un ta-siARN capaz de silenciar post-transcripcionalmente a uno o más genes en una o más pestes blanco

Ejemplo 14

Este ejemplo ilustra la comparación de las secuencias de cADN del CRW con secuencias de fuentes diferentes del CRW y la identificación de (1)

secuencias en común con aquellas otras fuentes de secuencias y (2) secuencias que son únicas para el CRW Las secuencias de cADN que están conservadas entre dos organismos son candidatos potenciales para el iARN que pueden ser usados para apuntar al blanco de la expresión génica y la función de ambos organismos Alternativamente, puede ser deseable seleccionar secuencias para la supresión génica del CRW para las cuales no se conoce la presencia de secuencias homólogas en (a) otros organismos que constituyen pestes, (b) organismos que no son blanco, y (c) el genoma de la planta seleccionada para la transformación con la secuencia de supresión del CRW

Se seleccionaron seis secuencias de cADN del CRW para la comparación con secuencias de otras fuentes Las secuencias específicas incluyeron secuencias que codificaban para la alfa-tubulina, la beta-tubulina, la CHD3, la subunidad E de la bomba de protones de las vacuolas, la subunidad A de la V-ATPasa, y proteínas filamentosas Las secuencias nucleotídicas se muestran en la SEQ ID Nº·98, SEQ ID Nº:99, SEQ ID Nº:100, SEQ ID Nº:101, SEQ ID Nº 102 y SEQ ID Nº 103, respectivamente Se compararon las secuencias de cADN del CRW con todo el cADN público de varios organismos a partir del GenBank usando el programa Megablast del NCBI (Altschul et al , *J Mol. Biol* 215 403-410, 1990), siendo los parámetros de búsqueda los siguientes

-W 21 -b50 -v50

que requieren al menos una coincidencia de 21-meros y que retienen sólo las 50 mejores coincidencias y alineamientos Los resultados fueron filtrados para incluir sólo a los organismos del orden *Insecta*, y la abeja de la miel (*Apis mellifera*) fue excluida. A pesar de que el análisis fue hecho sólo sobre las seis secuencias de cADN del CRW, el mismo proceso puede ser aplicado a todo el

cADN o a las secuencias Unigene del CRW o de otro organismo de interés sin una excesiva carga o experimentación.

Usando las seis secuencias de cADN del CRW, se identificaron un total de 145 coincidencias con 20 organismos de insectos diferentes Éstos incluyeron algunas especies de pestes, como el pulgón de la arveja (*Acyrthosiphon pisum*), el psílido Asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*) y el piojo humano (*Pediculus humanus*).

Los resultados se presentan en la Tabla 4 a continuación, con las coordenadas de coincidencia (*coincidencia*) sobre la secuencia preguntada (*consulta*) y el impacto (*acierto*), el porcentaje de identidad de la coincidencia, y la especie de insecto a partir de la cual la secuencia resultado fue derivada Por ejemplo, se identificó a un segmento desde la posición del nucleótido 844 hasta la 1528 de la SEQ ID N°:98 por ser sustancialmente idéntico a un segmento desde la posición del nucleótido 812 hasta la 128 de la secuencia de número de acceso del GenBank GI 47521748 derivada del pulgón de la arveja (*Acyrthosiphon pisum*) Estas dos secuencias comparten alrededor de un 85% de identidad.

Tabla 4 Secuencias de Unigene del CRW y los homologos de la secuencia nucleotídica de Insectos

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] 2	Gen ID[3]	Posicion de Identidad[4]	% Identidad[5]	Genero y Especie[6]
98	171-1529	GI 14279671	89-1447	83%	Chironomus tentans
98	175-938	GI 60297223	69-832	88%	*Diaprepes abbreviatus*
98	171-779	GI 49394745	79-687	89%	*Drosophila melanogaster*
98	769-1528	GI 47537494	827-68	85%	*Acyrthosiphon pisum*
98	529-1339	GI 55814359	56-865	85%	*Acyrthosiphon pisum*
98	729-1469	GI 46995994	1-741	85%	*Acyrthosiphon pisum*
98	171-740	GI 49395093	79-652	88%	*Drosophila melanogaster*
98	166-903	GI 60297353	68-804	85%	*Diaprepes abbreviatus*
98	171-875	GI 37593891	66-769	85%	*Pediculus humanus*

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] [2]	Gen ID[3]	Posicion de Identidad[4]	% Identidad[5]	Genero y Especie[6]
98	844-1528	GI 47521748	812-128	85%	*Acyrthosiphon pisum*
98	351-1255	GI 55798571	1-903	83%	*Acyrthosiphon pisum*
98	862-1528	GI 55815587	8-674	86%	*Acyrthosiphon pisum*
98	415-1520	GI 19773419	309-1414	81%	*Bombyx mori*
98	171-296	GI 19773419	65-190	88%	*Bombyx mori*
98	415-1520	GI 608680	309-1414	81%	*Bombyx mori*
98	171-296	GI 608680	65-190	88%	*Bombyx mori*
98	738-1434	GI 55811699	1-697	85%	*Acyrthosiphon pisum*
98	171-899	GI 37593910	70-799	85%	Pediculus humanus
98	171-1029	GI 55799535	53-911	83%	*Acyrthosiphon pisum*

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] [2]	Gen ID[3]	Posicion de Identidad[4]	% Identidad[5]	Género y Especie[6]
98	817-1492	GI 35508998	7-681	85%	*Acyrthosiphon pisum*
98	171-845	GI 25959177	50-724	85%	*Meladema coriacea*
98	862-1528	GI 55803725	726-60	85%	*Acyrthosiphon pisum*
98	171-695	GI 49394718	79-603	88%	*Drosophila melanogaster*
98	838-1528	GI 55813912	827-137	85%	*Acyrthosiphon pisum*
98	171-692	GI 49395499	54-575	88%	*Drosophila melanogaster*
98	171-1025	GI 46997250	92-945	83%	*Acyrthosiphon pisum*
98	171-1022	GI 47533429	4-855	83%	*Acyrthosiphon pisum*
98	171-998	GI 34788002	122-949	83%	*Callosobruchus maculatus*
98	171-839	GI 25959137	50-717	85%	*Meladema coriacea*

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] [2]	Gen ID [3]	Posicion de Identidad[4]	% Identidad[5]	Género y Especie[6]
98	171-677	GI 49395221	84-590	88%	*Drosophila melanogaster*
98	171-809	GI 25959136	50-688	86%	*Melademia coriacea*
98	171-816	GI 37593801	66-712	85%	*Pediculus humanus*
98	171-816	GI 37593472	67-712	85%	*Pediculus humanus*
98	171-848	GI 25959229	47-724	85%	*Melademia coriacea*
98	171-677	GI 49395496	75-581	88%	*Drosophila melanogaster*
98	171-659	GI 49395250	83-571	89%	Drosophila melanogaster
98	171-1029	GI 46997155	98-953	83%	*Acyrthosiphon pisum*
98	904-1528	GI 47519891	752-128	86%	*Acyrthosiphon pisum*
98	199-1061	GI 55813341	8-870	83%	*Acyrthosiphon pisum*

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] [2]	Gen ID[3]	Posicion de Identidad[4]	% Identidad[5]	Genero y Especie[6]
98	760-1430	GI 60298750	9-679	85%	*Diaphonna citri*
98	171-998	GI 46997667	106-933	83%	*Acyrthosiphon pisum*
98	171-785	GI 25959104	69-684	85%	*Meladema coriacea*
98	922-1528	GI 25959369	697-91	86%	*Meladema coriacea*
98	922-1528	GI 25959412	698-92	86%	*Meladema coriacea*
98	171-772	GI 25959233	68-669	86%	*Meladema coriacea*
98	171-677	GI 49395121	74-582	88%	*Drosophila melanogaster*
98	199-1029	GI 47534273	1-830	83%	*Acyrthosiphon pisum*
99	90-1385	GI 34787982	56-1351	83%	*Callosobruchus maculatus*
99	74-797	GI 25958562	14-739	88%	*Curculio glandium*

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] [2]	Gen ID[3]	Posición de Identidad[4]	% Identidad[5]	Genero y Especie[6]
99	572-1374	GI 60297081	25-827	86%	*Diaprepes abbreviatus*
99	100-1425	GI 19773425	91-1416	81%	*Bombyx mori*
99	100-1425	GI 2073100	111-1436	81%	*Bombyx mori*
99	55-738	GI 60297565	7-684	87%	*Diaprepes abbreviatus*
99	131-1425	GI 39842328	28-1322	81%	Laodelphax striatellus
99	688-1449	GI 60298019	9-770	85%	*Diaprepes abbreviatus*
99	61-606	GI 49394901	10-557	87%	*Drosophila melanogaster*
99	61-605	GI 49395418	12-558	87%	*Drosophila melanogaster*
99	100-1008	GI 2613140	68-976	81%	*Manduca sexta*
99	1064-1416	GI 2613140	1032-1384	83%	*Manduca sexta*

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] [2]	Gen ID[3]	Posicion de Identidad[4]	% Identidad[5]	Genero y Especie[6]
99	61-573	GI 49395445	15-528	87%	*Drosophila melanogaster*
99	40-582	GI 49395189	4-551	86%	*Drosophila melanogaster*
99	104-918	GI 47518537	27-841	82%	*Acyrthosiphon pisum*
99	104-784	GI 25959017	39-719	83%	*Meladema coriacea*
99	104-879	GI 47538212	85-860	82%	*Acyrthosiphon pisum*
99	104-852	GI 47520002	32-780	82%	*Acyrthosiphon pisum*
99	104-789	GI 47519819	118-803	83%	*Acyrthosiphon pisum*
99	104-789	GI 47532797	106-791	83%	*Acyrthosiphon pisum*
99	100-708	GI 53910346	73-681	84%	*Heliconius erato petiverana*
99	100-880	GI 6902132	54-834	82%	*Bombyx mori*

SEQ ID Nº[1]	Posicion de Identidad[2] [2]	Gen ID [3]	Posicion de Identidad[4]	% Identidad[5]	Genero y Especie[6]
99	104-789	GI 46999310	91-777	83%	*Acyrthosiphon pisum*
101	113-263	GI 41578101	124-274	90%	*Culicoides sonorensis*
101	113-263	GI 41577171	65-215	90%	*Culicoides sonorensis*
101	113-308	GI 15466250	140-335	86%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 15530478	140-335	85%	*Drosophila melanogaster*
101	112-308	GI 15516090	140-336	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 49393479	52-247	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-263	GI 41577256	99-249	88%	*Culicoides sonorensis*
101	113-308	GI 41403307	84-279	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 41402978	79-274	85%	*Drosophila melanogaster*

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] [2]	Gen ID[3]	Posicion de Identidad[4]	% Identidad[5]	Genero y Especie[6]
101	113-308	GI 41401487	82-277	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 38628155	176-371	85%	*Drosophila melanogaster*
101	118-293	GI 16901350	70-245	87%	*Ctenocephalides felis*
101	118-293	GI 16900951	78-253	87%	*Ctenocephalides felis*
101	113-308	GI 14708726	170-365	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14707923	171-366	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14708035	139-334	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14705944	135-330	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14705959	95-290	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14705165	108-303	85%	*Drosophila melanogaster*

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] [2]	Gen ID[3]	Posicion de Identidad[4]	% Identidad[5]	Genero y Especie[6]
101	113-308	GI 14703451	150-345	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI 14703188	95-290	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14700853	108-303	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14700635	136-331	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14699645	95-290	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14697887	94-289	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14697103	136-331	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14696099	137-332	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14696107	136-331	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14695238	95-290	85%	*Drosophila melanogaster*

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] [2]	Gen ID[3]	Posicion de Identidad[4]	% Identidad[5]	Genero y Especie[6]
101	113-308	GI 14693081	133-328	85%	*Drosophila melanogaster*
101	113-308	GI 14691490	138-333	85%	*Drosophila melanogaster*
102	694-1364	GI 2454487	811-1481	84%	*Aedes aegypti*
102	715-1220	GI 22039978	3-507	86%	*Ctenocephalides felis*
102	694-1175	GI 4734043	166-647	85%	*Aedes aegypti*
102	895-1286	GI 16899106	3-393	87%	*Ctenocephalides felis*
102	895-1286	GI 16899780	6-395	87%	*Ctenocephalides felis*
102	895-1286	GI 16899721	6-396	86%	*Ctenocephalides felis*
102	961-1286	GI 22039013	8-333	87%	Ctenocephalides felis
102	874-1327	GI 33376955	30-483	83%	*Glossina morsitans*

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] [2]	Gen ID [3]	Posicion de Identidad[4]	% Identidad[5]	Genero y Especie[6]
102	636-1136	GI 46997165	360-859	81%	*Acyrthosiphon pisum*
102	874-1220	GI 33376948	25-371	84%	*Glossina morsitans morsitans*
102	943-1364	GI 3514814	74-495	82%	*Drosophila melanogaster*
102	943-1364	GI 24583987	1055-1476	82%	*Drosophila melanogaster*
102	694-884	GI 24583987	806-996	82%	*Drosophila melanogaster*
102	943-1364	GI 24583985	967-1388	82%	*Drosophila melanogaster*
102	694-884	GI 24583985	718-908	82%	*Drosophila melanogaster*
102	943-1364	GI 24583983	1052-1473	82%	*Drosophila melanogaster*
102	694-884	GI 24583983	803-993	82%	*Drosophila melanogaster*
102	943-1364	GI 18467973	1049-1470	82%	*Drosophila melanogaster*

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] [2]	Gen ID [3]	Posicion de Identidad[4]	% Identidad[5]	Genero y Especie[6]
102	694-884	GI 18467973	800-990	82%	*Drosophila melanogaster*
102	943-1364	GI 19527546	1052-1473	82%	*Drosophila melanogaster*
102	694-884	GI 19527546	803-993	82%	*Drosophila melanogaster*
102	1045-1365	GI 4734199	1-321	84%	*Aedes aegypti*
102	943-1280	GI 51961912	81-418	83%	*Drosophila simulans*
102	734-947	GI 22039138	73-285	87%	*Ctenocephalides felis*
102	959-1364	GI 24583991	1081-1486	81%	Drosophila melanogaster
102	959-1364	GI 18467977	1081-1486	81%	*Drosophila melanogaster*
102	943-1340	GI 21355198	994-1391	81%	*Drosophila melanogaster*
102	694-884	GI 21355198	745-935	82%	*Drosophila melanogaster*

393

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] [2]	Gen ID [3]	Posición de Identidad[4]	% Identidad[5]	Genero y Especie[6]
102	959-1364	GI 19528270	1021-1426	81%	*Drosophila melanogaster*
102	959-1364	GI 18859618	951-1356	81%	*Drosophila melanogaster*
102	943-1340	GI 1373432	994-1391	81%	*Drosophila melanogaster*
102	694-884	GI 1373432	745-935	82%	*Drosophila melanogaster*
102	959-1364	GI 5851682	1021-1426	81%	*Drosophila melanogaster*
102	142-345	GI 22039875	163-366	87%	*Ctenocephalides felis*
102	142-345	GI 16901137	217-420	87%	*Ctenocephalides felis*
102	82-595	GI 34787824	112-625	79%	*Callosobruchus maculatus*
102	142-345	GI 16901267	156-360	87%	*Ctenocephalides felis*
102	771-1022	GI 22005558	58-309	84%	*Aedes aegypti*

394

SEQ ID N°[1]	Posicion de Identidad[2] 2	Gen ID[3]	Posicion de Identidad[4]	% Identidad[5]	Genero y Especie[6]
102	96-357	GI 46996282	118-379	83%	*Acyrthosiphon pisum*
102	963-1364	GI 18898890	11-412	80%	*Anopheles gambiae*
102	967-1364	GI 18936027	25-422	80%	*Anopheles gambiae*
102	61-344	GI 37952369	124-407	81%	*Ips pini*
103	1230-1251	GI 33371240	247-268	100%	*Glossina morsitans*
103	1230-1251	GI 33374947	249-270	100%	*Glossina morsitans*

1 SEQ ID N° del WCR que se muestra en el listado de secuencias,

2 Posicion nucleotidica en la SEQ ID N° de la columna 1 que exhibe una identidad substancial con la Gene ID de la columna 3 sobre la misma fila,

3 Numero de acceso al gen de la secuencia correspondiente con la que coincide, identificada dentro de la base de datos publica, y que exhibe una identidad substancial con la SEQ ID N° de la columna 1,

4 Posicion nucleotidica de la secuencia identificada en la columna 3 que coincide con los nucleotidos del CRW especificados en la misma fila

5 Porcentaje de identidad entre la SEQ ID N° del WCR y la Gene ID (comparación de identidad entre las secuencias de la columna 2 y la columna 4 sobre cualquier fila dada), y

6 Género y especie del organismo del cual se derivo el N° de Acceso al Gen de la secuencia

Ejemplo 15

Este ejemplo ilustra la identificación de los dominios funcionales de la proteína predichos y de las familias génicas a partir de la traducción de las secuencias nucleotídicas desveladas en la presente utilizando las coincidencias de la secuencia para conocer secuencias y modelos de dominios consenso

Las secuencias proteicas fueron primero producidas con un programa "traductor", el cual tradujo los Unigenes en secuencias peptídicas a través de los siguientes pasos. homología con las proteínas conocidas; predicción *ab initio* de la estructura génica basada en modelos, y los marcos de lectura abierta más largos (ORF). Se corrigieron los cambios de marco debidos a errores de secuenciación. Entonces, se buscaron las secuencias proteicas en la base de datos Pfam, una gran colección de múltiples alineamientos de secuencias y modelos de Markov ocultos (HMM) que cubren muchas familias comunes de proteínas (The Pfam Protein Families Database, Bateman et al , *Nucleic Acids Research* 32:D138-D141, 2004) Se buscaron los modelos HMM de proteínas con el programa HMMPAM (Durbin et al., Biological Sequence Analysis. Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids, Cambridge University Press, 1998), utilizando las astringencias que se encuentran por defecto Se realizó un filtrado posterior para mantener sólo a aquellas coincidencias con un valor de esperanza de 0,1 o menor como coincidencias significativas. De las 20303 secuencias peptídicas del gusano de la raíz del maíz, 4199 (21%) fueron identificadas con 1317 dominios proteicos y familias distintos.

Los resultados del análisis fueron presentados en los campos de características del archivo de listado de las secuencias con estos atributos. nombre Pfam, descripción Pfam, y nivel de coincidencia con el puntaje HMMPFAM, valor esperado (E-value) y número de copias del dominio en la secuencia peptídica.

Ejemplo 16

Este ejemplo ilustra un método para proveer una secuencia de ADN para el silenciamiento génico mediado por dsARN De forma más específica, este ejemplo describe la selección de un ADN mejorado útil en el silenciamiento génico mediado por dsARN mediante (a) la selección a partir de un gen blanco una secuencia de ADN que incluya más de 21 nucleótidos contiguos, (b) la identificación de al menos una secuencia de ADN más corta derivada de algunas regiones de la secuencia inicial de ADN que consista en regiones que hayan sido predichas para no generar polipéptidos indeseables; y (c) la selección de una secuencia de ADN para el silenciamiento génico mediado por dsARN que incluya al menos una secuencia de ADN más corta Los polipéptidos indeseables incluyen, pero no están limitados a, polipéptidos homólogos a polipéptidos alergénicos y polipéptidos homólogos a toxinas polipeptídicas conocidas

Se ha demostrado que la V-ATPasa del WCR funciona en los ensayos de alimentación del gusano de la raíz del maíz para evaluar el silenciamiento génico mediado por dsARN como un medio de control del crecimiento larval Se seleccionó una secuencia de cADN de un gen vacuolar de la ATPasa (V-ATPasa) del gusano de la raíz del maíz del Oeste (WCR) (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) para ser utilizado como una secuencia de ADN inicial (SEQ ID Nº. 104) Esta secuencia de ADN inicial fue revisada en cuanto a que cada fragmento contiguo que incluya al menos 21 nucleótidos dentro de las regiones, coincidiera con menos de 21 de 21 nucleótidos contiguos de las secuencias conocidas de los vertebrados Se identificaron tres segmentos de secuencias mayores de alrededor de 100 nucleótidos contiguos que se encontraban libres de los aciertos de 21/21 de ese tipo; un primer segmento de secuencia correspondiente a la posición de los nucleótidos 739-839, un segundo segmento de secuencia correspondiente a la posición de los nucleótidos 849-

987, y un tercer segmento de secuencia correspondiente a la posición de los nucleótidos 998-1166 que se muestran en la SEQ ID Nº·104. Estos tres segmentos de secuencia fueron combinados para construir una secuencia de ADN quimérica (SEQ ID Nº 1) para ser utilizada en el silenciamiento génico mediado por dsARN de la correspondiente secuencia codificante de la V-ATPasa del CRW La nueva secuencia quimérica de ADN fue evaluada en el bioensayo del CRW descripto anteriormente

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes publicadas, mencionadas en esta especificación son incorporadas en la presente por referencia como si cada publicación o patente individual estuviera especialmente e individualmente indicada para ser incorporada por referencia

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Monsanto Technology LLC
Baum, James A
Gilbertson, Larry A
Kovalic, David K
LaRosa, Thomas J
Lu, Maolong
Munyikwa, Tichifa R. I.
Roberts, James K
Wu, Wei
Zhang, Bei

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE INSECTOS EN PLANTAS

<130> 38-21(53597)A AR

<150> 60560842
<151> 2004-04-09

<150> 60565632
<151> 2004-04-27

<150> 60579062
<151> 2004-06-11

<150> 60603421

<151> 2004-08-20

<150> 60617261
<151> 2004-10-11

<160> 174

<210> 1
<211> 409
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 1
ggacaagaaa cttgcccaac gtaagcactt cccttcagta gactggcttg gatcatattc 60

caaatattta agagcattgg acgactttta tgacaaaaac tttattcctc ttagaaccaa 120

agttaaggaa attcttcagg aagaagatga tctagccgaa attgtgcagc tggtaggtaa 180

agcatctctg gcagaaacgg acaaaatcac cttggaaatt gccaggcttc ttaaagaaga 240

caaaactcat actcttctta tgacagattc tgtccattct ataaaactgt cggtatgttg 300

agaaacatga tcggtttgta cgacatggcg agacacgctg tagaatcaac cgcacaatca 360

gaaaataaga tcacttggaa cgtaataaga gattcaatga gtggaattt 409

<210> 2
<211> 157
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 2
atgtttcagg tgggctcaat aagcaccaac tttcaatttt atttttcatt tttgtattta 60

tttacagtaa ctcctcagtt tgctaacaat attacattgt taacgcattc atatgttgtt 120

taatataata gttttggaat ataattacaa gtttgtc 157

<210> 3
<211> 338
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 3
atttttattc tgttaatagt ttttcacatt tcatgtttca cacatactta gatctagtca 60

agattgttag agttttggca aagaaattaa ataaaaattc ttttcataaa aatcatttct 120

ttaatattac attagagaaa aattatattt ttatactgag tacaaatttg aacaagttat 180

taattttaag ttacaaaata cgcttttata ggttaacaat tatcaaagcg cttaaatcta 240

atagatacta cacaacatta aggactgcaa accatatctt tcacgaagta atccctacta 300

gtgaccaatt gctcgctagg agcagatgca aattacac 338

<210> 4
<211> 458
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 4
aaaagagtga ggaaacaggt taattataat gacggaggaa tgacaactga cacacgagaa 60

gatacgacat ggcaagaaaa tctctctgat taccattctg acttttctgc gggatcggat 120

gaggataagg aagacgatga tttcgatgag aagaacgacg ccgatttaag cagaaggagt 180

cgaagaaaga tggaaaggaa agacgagaag gatcgtcctt taccaccgtt actagccaga 240

gttggcggca atattgaagt actcggtttt aatgccaggc agcgtaaagc gttccttaat 300

gctattatgc gctacggaat gccaccacaa gacgctttca attcacagtg gctggtgaga 360

gatcttcgag gaaaatctga gaagatattc aaggcttacg tgtctctctt tatgaggcat 420

ctttgcgaac ctggtgcaga taatgctgat acgtttgc 458

<210> 5
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 5
taatacgact cactataggg agagacggag gaatgacaac tgaca 45

<210> 6
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 6
taatacgact cactataggg agattccgta gcgcataata gcat 44

<210> 7
<211> 335

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 7
taatacgact cactataggg agagacggag gaatgacaac tgacacacga gaagacacga 60

catggcaaga aaatctctcc gattaccatt ctgacttttc tgcgggatca gatgaggata 120

aggaagacga tgatttcgat gagaagaacg acgccgattt aagcagaaga agtcgaagaa 180

agatggaaag aaaagacgag aaggaccgtc cactaccacc gttactagcc agagttgggg 240

gaaatattga agtgctcggt tttaatgcca ggcagcgtaa agcgttcctt aatgctatta 300

tgcgctacgg aatctcccta tagtgagtcg tatta 335

<210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 8
tctgaattct ccgtagcgca taatagcat 29

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 9
gacgccgatt taagcagaag a 21

<210> 10
<211> 171
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 10
tctgaattct ccgtagcgca taatagcatt aaggaacgct ttacgctgcc tggcattaaa 60

accgagcact tcaatatttc ccccaactct ggctagtaac ggtggtagtg gacggtcctt 120

ctcgtctttt ctttccatct ttcttcgact tcttctgctt aaatcggcgt c 171

<210> 11
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 11
tcttctgctt aaatcggcgt cgaagacacg acatggcaag aaaat 45

<210> 12
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 12
gatcccgcag aaaagtcaga atggtaatcg ga 32

<210> 13
<211> 112
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 13
tcttctgctt aaatcggcgt cgaagacacg acatggcaag aaaatctctc cgattaccat 60

tctgactttt ctgcgggatc tccgattacc attctgactt ttctgcggga tc 112

<210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 14
ctccgattac cattctgact tttc 24

<210> 15
<211> 30

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 15
tctggatcct tccgtagcgc ataatagcat 30

<210> 16
<211> 245
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 16
ctccgattac cattctgact tttctgcggg atcagatgag gataaggaag acgatgattt 60

cgatgagaag aacgacgccg atttaagcag aagaagtcga agaaagatgg aaagaaaaga 120

cgagaaggac cgtccactac caccgttact agccagagtt gggggaaata ttgaagtgct 180

cggttttaat gccaggcagc gtaaagcgtt ccttaatgct attatgcgct acggaaggat 240

ccaga 245

<210> 17
<211> 473
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 17
tctgaattct ccgtagcgca taatagcatt aaggaacgct ttacgctgcc tggcattaaa 60

accgagcact tcaatatttc ccccaactct ggctagtaac ggtggtagtg gacggtcctt 120

ctcgtctttt ctttccatct ttcttcgact tcttctgctt aaatcggcgt cgaagacacg 180

acatggcaag aaaatctctc cgattaccat tctgactttt ctgcgggatc tccgattacc 240

attctgactt ttctgcggga tcagatgagg ataaggaaga cgatgatttc gatgagaaga 300

acgacgccga tttaagcaga agaagtcgaa gaaagatgga aagaaaagac gagaaggacc 360

gtccactacc accgttacta gccagagttg ggggaaatat tgaagtgctc gttttaatgc 420

caggcagcgt aaagcgttcc ttaatgctat tatgcgctac ggaaggatcc aga 473

<210> 18

<211> 536

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 18

accgccatca tgttattggc atcacacatg tgctgtgtga gctctggaac tttcaacggt 60

ctgtattgtt ggctgcctct tgaggtgagt ggagcgaatc cgggcatgaa gaagtggaga 120

cgggggaagg gaaccatgtt gacagccaat tttctaagat cagcattcaa ctgacctggg 180

aacctaagac aggtggttac accggacatt gtgagggata ccaaatggtt taagtctcca 240

tatgtgggtg ttgtgagttt caaagttctg aagcaaatgt catagagagc ttcattatca 300

atacagtatg tttcatctgt gttttctacc aattgatgta ctgaaagtgt ggcattgtat 360

ggttctacta cggtatctga tactttgggt gaggggacta ctgagtatgt gttcataatt 420

ctgtctgggt attcttcacg gatttttgag atagggaggg tacccatacc tgatccagta 480

ccacctccaa gtgagtgtgt gagttggaat ccttgtaaac aatcacatga tcagct 536

<210> 19

<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 19
taatacgact cactataggg agagaatccg ggcatgaaga agtg 44

<210> 20
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 20
taatacgact cactataggg agacaaaaat ccgtgaagaa tacc 44

<210> 21
<211> 399
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 21

taatacgact cactataggg agagaatccg ggcatgaaga agtggagacg ggggaaggga 60

accatgttga cagccaattt tctaagatca gcattcaact gacctgggaa cctaagacag 120

gtggttacac cggacattgt gagggatacc aaatggttta agtctccata tgtgggtgtt 180

gtgagtttca aagttctgaa gcaaatgtca tagagagctt cattatcaat acagtatgtt 240

tcatctgtgt tttctaccaa ttgatgtact gaaagtgtgg cattgtatgg ttctactacg 300

gtatctgata ctttgggtga ggggactact gagtatgtgt tcataattct gtctgggtat 360

tcttcacgga tttttgtctc cctatagtga gtcgtatta 399

<210> 22

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 22

actgaattct ccgggcatga agaagt 26

<210> 23
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 23
tattcttcac ggatttgac 19

<210> 24
<211> 267
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 24
actgaattct ccgggcatga agaagtggag acgggggaag ggaaccatgt tgacagccaa 60

ttttctaaga tcagcattca actgacctgg gaacctaagg caggtggtta caccggacat 120

tgtgagggat accaaatggt ttaagtctcc gtatgtgggt gttgtgagtt tcaaagttct 180

gaagcaaatg tcatagagag cttcattatc aatacagtat gtttcatctg tgttttctac 240

caattgatgt caaatccgtg aagaata 267

<210> 25
<211> 17
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 25
caaatccgtg aagaata 17

<210> 26
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 26

ctgaaagtgt ggcgttgta 19

<210> 27
<211> 106
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 27
caaatccgtg aagaataccc agatagaatt atgaacacat actcagtagt cccctctccc 60

aaagtatcag ataccgtagt agaaccatac aacgccacac tttcag 106

<210> 28
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 28
tagaaccata caacgccaca ct 22

<210> 29
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 29
tctggatcca cgggggaagg gaacc 25

<210> 30
<211> 257
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 30
tagaaccata caacgccaca ctttcagtac atcaattggt agaaaacaca gatgaaacat 60

actgtattga taatgaagct ctctatgaca tttgcttcag aactttgaaa ctcacaacac 120

ccacatacgg agacttaaac catttggtat ccctcacaat gtccggtgta accacctgcc 180

ttaggttccc aggtcagttg aatgctgatc ttagaaaatt ggctgtcaac atggttccct 240

tcccccgtgg atccaga 257

<210> 31
<211> 586
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 31
actgaattct ccgggcatga agaagtggag acgggggaag ggaaccatgt tgacagccaa 60

ttttctaaga tcagcattca actgacctgg gaacctaagg caggtggtta caccggacat 120

tgtgagggat accaaatggt ttaagtctcc gtatgtgggt gttgtgagtt tcaaagttct 180

gaagcaaatg tcatagagag cttcattatc aatacagtat gtttcatctg tgttttctac 240

caattgatgt caaatccgtg aagaataccc agatagaatt atgaacacat actcagtagt 300

cccctctccc aaagtatcag ataccgtagt agaaccatac aacgccacac tttcagtaca 360

tcaattggta gaaaacacag atgaaacata ctgtattgat aatgaagctc tctatgacat 420

ttgcttcaga actttgaaac tcacaacacc cacatacgga gacttaaacc atttggtatc 480

cctcacaatg tccggtgtaa ccacctgcct taggttccca ggtcagttga atgctgatct 540

tagaaaattg gctgtcaaca tggttccctt cccccgtgga tccaga 586

<210> 32
<211> 399
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 32
acgcgtccag ttaatatccc gtgagatatt tttgcagtcc ttttaataag attcttcata 60

attcaccatg aagggctgcg ttttcaacat cgacaacggt tatttggaag gcctgtgtcg 120

tggctttaaa tgtgggatcc tgaaacacgc cgattatttg aatttggtcc agtgtgaaac 180

tcttgaagat ttaaaactgc acttgcaagg cactgactat ggaacttttt tggccaatga 240

accttcacct ttgtcagtat ccgtcatcga ttcaagactt cgacaaaaac tcctgattga 300

gttccagcac atgcgtaacc aagcagtaga gcctctctcg acatttatgg gcttcattac 360

ctacagttac atgatcgaca acataatttt gcttattac 399

<210> 33
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 33
taatacgact cactataggg agaaacggtt atttggaagg 40

<210> 34
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 34
taatacgact cactataggg agattgtcga tcatgtaact gta 43

<210> 35
<211> 291
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 35

taatacgact cactataggg agaaacggtt atttgcaagg tttgactgta tattattatt 60

tttatgtatc gacatygatg aattgattta tttatcgtaa agaaattcaa atacatttaa 120

agcttcaaat attaataata atgaacaagc tttgaagggt tacaaacaac caatcgatct 180

attaatatag tctattgact ctgaagttgc aaacggtaat agggccaatg caatggtttg 240

attctcccta cagttacatg atcgacaact ccctatagtg agtcgtatta a 291

<210> 36

<211> 451

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 36

ccacatacca cgctatgaaa ccccccttata tggggccgat ctaacaggag tgtggaactc 60

tatatccatt atatctaaaa tggttaacag aaaagaattc ataattaaca ttcaattgcc 120

attgtacacg tatattctgg taaatctact actactggac atttaattta caaatgtagt 180

ggtatcgaca aacttaccat cgaaaagttc caaaaagaat cccaacaaat gggtaaaggc 240

taattcaaat atgcctgggt actctacata cttacagccc atagagaacg tggtattacc 300

attgatattg ctgtgcggaa attcgaaaca gctaaatact attgaaccat cattgatgcc 360

cctggcacag atatttcatt aataacatta tcactggtac attacaatct gactgtgctg 420

tactcattga tgcaactggt acttggtaat t 451

<210> 37
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 37
taatacgact cactataggg agacacgcta tgaaaccccc ttat 44

<210> 38
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 38

taatacgact cactataggg agatttcgaa tttccgcaca gc 42

<210> 39

<211> 933

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 39

taatacgact cactataggg agatttcgaa tttccgcaca gcaagtgtgt aacttaaatt 60

tcaaaaaact tttcgttgtc ccaatttttt ttcataatct tagcggttac gattcgcata 120

tgatgattag agatcttgcg aaaaatggta gtatcagctt actaccaata aataaggaaa 180

agtatatttc atttacaata tacgattctg aggtcagtat taggttgagg ttcgttgatt 240

cactgagatt tttaaattca tcattggaca agttggctgc cacattgcaa cctgaggatt 300

taagatattt agctagcgaa tttccaaata ccactaccga acaaatggaa ttattgaaac 360

gaaaaggcat attcccatac gaatatattg agtctttcaa taaattgaat gaaacgcaac 420

taccatcaat tgataaattt tacagctcat tatcgggtga aaacatctcc aaaaatatgt 480

atcatcatgc tcagaatgtt tggcagtcat tcggtattaa aaatattttg gaatatagta 540

tgttgtacat gaaaactgat attatgttac tgacttgcat ttttgaaaat tttcgacaaa 600

aatgtcgaag tacatacagt cttgatcctg catggtacta taccatgcct ggattttctt 660

gggatgcaat gcttaaatat actggatgta aacttgaact gctgaatgat atcgataaaa 720

tcatgtttat tgagaaagct atccgaggtg gtataagtca agtaagtaat cggtattctg 780

aggcaaataa caaatacatg cataattatg atccatcaaa gcctagtaaa tatgtgctat 840

atttagatgt caacaatttg tatggttggg caatgtctca attattacca taaggggtt 900

tcatagcgtg tctccctata gtgagtcgta tta 933

<210> 40
<211> 918
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 40
cccaagcgtc cgcccacgcg tccgcccacg cggcccccc cgccgcccgc acggtgtgga 60

cctcgcgcct ggtgttacat cccaagtagt gttcctttta ttctaagttt aatttcgaac 120

agttgcattt actttatttc caaacaatca aaatgggtaa agaaaagatt catattaaca 180

tcgttgtcat tggacacgta gattctggta aatctactac tactggacat ttaatttaca 240

aatgtggtgg tatcgacaaa cgtaccatcg aaaagttcga aaaagaagcc caagaaatgg 300

gtaaaggttc attcaaatat gcctgggtac tcgacaaact taaggccgag agagaacgtg 360

gtattaccat tgatattgct ttgtggaaat tcgaaacagc taaatactat gtaaccatca 420

ttgatgcccc tggacacaga gatttcatta agaacatgat cactggtaca tcacaagctg 480

actgtgctgt actcattgtt gcagctggta ctggtgaatt tgaagcaggt atttcaaaga 540

atggacaaac acgtgaacat gctcttcttg ctttcaccct tggtgtaaaa caacttattg 600

ttggtgtcaa caaaatggac tcgactgaac cagcatacag tgaatcacgt ttcgaggaaa 660

tcaagaagga agtatcctca tacatcaaga aaattggtta caacccagct gccgttgctt 720

tcgtaccaat ttcaggatgg cacggagaca acatgttaga aggatctgac aagatgccat 780

ggttcaaggg atggcaaatc gaacgtaaag aaggaaaagc tgaaggaaag tgcttgattg 840

aggctttgga tgctatcctt cccccacctc gtccaactga gaaacccctc cgtcttccac 900

tccaggatgt ctacaaaa 918

<210> 41
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 41
taatacgact cactataggg agacctcgcg cctggtgtta c 41

<210> 42
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 42
taatacgact cactataggg agaccaaggg tgaaagcaag aagag 45

<210> 43
<211> 569
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 43
taatacgact cactataggg agacctcgcg cctggtgtta catcccaagt agtgttcctt 60

ttattctaag tttaatttcg aacagttgca tttactttat ttccaaacaa tcaaaatggg 120

taaagaaaag attcatatta acatcgttgt cattggacac gtagattctg gtaaatctac 180

tactactgga catttaattt acaaatgtgg tggtatcgac aaacgtacca tcgaaaagtt 240

cgaaaaagaa gcccaagaaa tgggtaaagg ttcattcaaa tatgcctggg tactcgacaa 300

acttaaggcc gagagagaac gtggtattac cattgatatt gctttgtgga aattcgaaac 360

agctaaatac tatgtaacca tcattgatgc ccctggacac agagatttca ttaagaacat 420

gatcactggt acatcacaag ctgactgtgc tgtactcatt gttgcagctg gtactggtga 480

atttgaagca ggtatttcaa agaatggaca aacacgtgaa catgctcttc ttgctttcac 540

ccttggtctc cctatagtga gtcgtatta 569

<210> 44
<211> 440
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 44
tcgcgggccg acacacgcct ccatattaag tcttgaaagt catttttaaa aacattttaa 60

tttaaaagta gtatttttaa gatttttcat tttcacacca gttcataatg gcatctggtt 120

caatatacga cgctgcacat aagggagatt ttgaatatgt ttcccaaaag attgaagagg 180

atccactaat tataaaagca ccagactcta gtaaaaggct tctaattcat tgggcagttc 240

tcagcggaaa tgtaaagctt gttactcatt tactggaact tggatcttct gtgaacccct 300

cggatgatac agatatgaca ccattaatat tagcttcatc ggctggccat accgaagttg 360

tcaaattgtt attaaaaaaa tgtgatgatg tcaatcataa aaatgcacag ggtcattcat 420

cacttcagta tgcagcctcc 440

<210> 45
<211> 46
<212> ADN

<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 45
taatacgact cactataggg agaacgctgc acataaggga gatttt 46

<210> 46
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 46
taatacgact cactataggg agaggaggct gcatactgaa g 41

<210> 47
<211> 1113
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 47

taatacgact cactataggg agaacgctgc acataaggga gattttgact atgtttcaga 60

aaagattgaa gagtttccaa taattttaga agcaccagac tctgtaagtt gtaattattt 120

gtatattatt atctaacgtt aatctctaga cgaaccttta ttatatccaa tctctaccgt 180

gcaatactaa aatgtaccac gtacatttgt agttcctttg atttttttaa tttcattttt 240

ttaacaggtt ttgcaaatgt atacattttt attttggtta catagtcagg ttatacagtc 300

cgtataattt caataatttc tctatctagt atagaaccca tgtcacctta tcaacctatt 360

atcctgcata tttaaatgca gtaaaaccac atttaaaaac atattttctg gtatctcata 420

gccatttgta tcctctaatg gatgtgcata ggcttcttct aaagttttct agtttctatg 480

aagttacaaa gtagtttcct gttattctct tgagaacatt tgttcatatg ataggtggtt 540

catattatct gacagtttca gcttacaagt gaagcagtag catctccaga agatgccaac 600

ccctagtgtt ggtgaaacgt cgagaactac ttgacagtct aagagcccca acaaacagtt 660

taacaagttg gtgtgcattt agttgataga attctgtcag gttcttggat actccattgt 720

attggtttat tttatttaac taatttcctc tctcttggtt ctctttacta ttccaaacct 780

aaaaattttt tattgtatag attcattttg ttgttgagct tatatattgt gctattgacc 840

aataatcaaa tacttttttag agtaagaggc ttgtaattca ttgggcagtt ctcagcggaa 900

atgtaaagct tgttacctat ttactgaaac ttggatctcc tgtgaactcc tcagatgata 960

cagatatgac accattaata ttagcttcat cagctggcca taccgaagtt gtcaaattgt 1020

tattaaaaaa atgtgatgat gtcaatcata aaaatgcaca gggccattca tcacttcagt 1080

atgcagcctc cctccctata gtgagtcgta tta 1113

<210> 48
<211> 425
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 48
aggattttct gaagctgccg aagtaactgg actcaatcca gcccaaatat ccgtcattat 60

gaagaacctg atggctcgat tgggattcca gaagtactac cttcagggag gtgattgggg 120

ttccgcaata gtagccaact tagcatcatt attcccagaa aaagtgctgg gagtccattc 180

caatatgtgt atggtcaata gtatgctttc taatctaaaa ttagcattgg gtagttttat 240

gccatccttg attgttgatg ctgacaagca acatctcctt tatcccagaa tgaaacattt 300

tggattcctt atattggaaa gtggttatat gcatcttcag ggtagtaaac cagataccgt 360

tggtgtcgct ctacgtgata gccctgtagg tcttgcagct tacatcatag agaagtttca 420

cacat 425

<210> 49
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 49
taatacgact cactataggg agatctgaag ctgccgaagt aa 42

<210> 50
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 50
taatacgact cactataggg agatatcacg tagagcgaca ccaa 44

<210> 51
<211> 47
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 51
taatacgact cactataggg agactatgat gtaagctgca agaccta 47

<210> 52
<211> 95
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 52
taatacgact cactataggg agatcgcgat gagtagaccc aacacctctg gtaagggctc 60

tcatgcattg tttctcccta tagtgagtcg tatta 95

<210> 53
<211> 427
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 53
gacgcgcggg tcgatgcaag actctagata gagtcgtaat attgtcaact ttttcgtttc 60

ggtaaaattt atactaacta gccgtcagaa aagttactaa ttctccagtt atttaattga 120

gaatttgact ttattcgtca ctagcgcaat aactcagtat ggtgattatt aattcattta 180

aacaccccga gtctcctatt aggtatcaac aggacgatgt tcaagtctac ttagacaaga 240

aagatttggg cctgggaact ttatttgtta gtgaaagcac attatgctgg caacaagaag 300

agaacaatgg ttttgctatt gaatattcaa gtatttcctt gcatgccata tctaaagatt 360

taaacattca ttctacagaa tgtgtatacc tcgtgacaga tggacatatt actatgccag 420

gtgacag 427

<210> 54
<211> 43
<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 54

taatacgact cactataggg agactagccg tcagaaaagt tac 43

<210> 55

<211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 55

taatacgact cactataggg agaatggcat gcaaggaaat a 41

<210> 56

<211> 318

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 56

taatacgact cactataggg agactagccg tcagaaaagt tactaattct ccagttattt 60

aattgagaat ttgactttat tcgtcactag cgcaataact cagtatggtg attattaatt 120

catttaaaca ccccgagtct cctattaggt atcaacagga cgatgttcaa gtctacttag 180

acaagaaaga tttgggcctg ggaactttat ttgttagtga aagcacatta tgctggcaac 240

aagaagagaa caatggtttt gctattgaat attcaagtat ttccttgcat gccattctcc 300

ctatagtgag tcgtatta 318

<210> 57

<211> 431

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 57

caattattca cagaacaaca attatacaga atagaccact atttgggtaa ggaaatggta 60

cagaatttaa tgacacttcg atttggtaac agaatcttta accccacatg gaacagtgac 120

catatagctt ccatccaaat aaattgtaag gaacccttcg gaactgaagg cagaggaggg 180

tattttgacg aattcggcat tattagggat gtaatgcaga atcatatttt acaaattcta 240

gctctagtag ctatggaaaa accagcttca gttcaaccag acgatataag aaatgaaaag 300

gtaaaggtat taaaaagtat agctccaata aagctcaagg acgttgtatt gggtcagtac 360

gttggaaatc ctgatggaca aggtaatgcg aaattgggat acttagatga tccgagtgtt 420

cctaaagatt c 431

<210> 58
<211> 47
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 58
taatacgact cactataggg agaacagtga ccatatagct tccatcc 47

<210> 59
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 59
taatacgact cactataggg agaatttcgc attaccttgt ccatc 45

<210> 60
<211> 328
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 60
taatacgact cactataggg agaacagtga ccatatagct tccatccaaa taaattgtaa 60

ggaaccctte ggaactgaag gcagaggagg gtattttgac gaattcggca ttattaggga 120

tgtaatgcag aatcatattt tacaaattct agctctagta gctatggaaa aaccagcttc 180

agttcaacca gacgatataa gaaatgaaaa ggtaaaggta ttaaaaagta tagctccaat 240

aaagctcaag gacgttgtat tgggtcagta cgttggaaat cctgatggac aaggtaatgc 300

gaaattctcc ctatagtgag tcgtatta 328

<210> 61
<211> 483
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 61
acccacgcct accccgcccc gtgatattta gtgcttactt ggtacagcag tttcagtgct 60

gtgctttaga ataatttatt ttttaacatt tatatagaaa tcaaatacta accaatcaac 120

atgtgtgaag aagaagttgc cgctttagtc gtagacaatg gatccggtat gtgcaaagct 180

ggttttgctg gggatgatgc acctcgtgct gtattccctt caattgttgg acgcccaaga 240

catcagggtg tgatggtagg aatgggacaa aaagattcct atgtaggtga tgaagctcaa 300

agtaaaagag gtatccttac cttaaaatac cccatcgagc acggaatagt cacaaactgg 360

gatgatatgg agaaaatttg gcatcataca ttctacaatg aactcagagt agccccagaa 420

gaacaccctg ttctgttgac agaagctcct ctcaacccca aggccaacag ggaaaagatg 480

aca 483

<210> 62
<211> 45
<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 62

taatacgact cactataggg agaccgcccc gtgatattta gtgct 45

<210> 63

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 63

taatacgact cactataggg agactgttgg ccttggggtt gagag 45

<210> 64

<211> 503

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 64

taatacgact cactataggg agaccgcccc gtgatattta gtgcttactt ggtacagcag 60

tttcagtgct gtgctttaga ataatttatt ttttaacatt tatatagaaa tcaaatacta 120

accaatcaac atgtgtgaag aagaagttgc cgctttagtc gtagacaatg gatccggtat 180

gtgcaaagct ggttttgctg gggatgatgc acctcgtgct gtattccctt caattgttgg 240

acgcccaaga catcagggtg tgatggtagg aatgggacaa aaagattcct atgtaggtga 300

tgaagctcaa agtaaaagag gtatccttac cttaaaatac cccatcgagc acggaatagt 360

cacaaactgg gatgatatgg agaaaatttg gcatcataca ttctacaatg aactcagagt 420

agccccagaa gaacaccctg ttctgttgac agaagctcct ctcaacccca aggccaacag 480

tctccctata gtgagtcgta tta 503

<210> 65

<211> 407

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 65

aggtgaatgt tatatcgttt ttcaaagtgt aaggtgttta ttttcaaaaa gtttataaaa 60

taagcaatca ctatgggtaa tgtgtttgca aatttattca aaggcctctt tggcaaaaag 120

gaaatgagga tattgatggt acgactcgat gcagctggta aaaccacaat tttatataaa 180

cttaaattag gagaaattgt aacaactatt ccaacaattg gatttaatgt ggagactgta 240

gaatataaga acattagttt tacagtatgg gatgtaggtg gtcaagataa aattaggcca 300

ttgtggagac actatttcca aaacacacaa cgcctaattt tcgtagtaga cagtaaccac 360

acggaaacta acactgaggc taaagattaa ttaatgcgtt agttggg 407

<210> 66
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 66
taatacgact cactataggg agaactatgg gtaatgtgtt tg 42

<210> 67
<211> 40

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 67
taatacgact cactataggg agagtttccg tgtggttact 40

<210> 68
<211> 345
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 68
taatacgact cactataggg agaactatgg gtaatgtgtt tgcaaattta ttcaaaggcc 60

tctttggcaa aaaggaaatg aggatattga tggtacgact cgatgcagct ggtaaaacca 120

caattttata taaacttaaa ttaggagaaa ttgtaacaac tattccaaca attggattta 180

atgtggagac tgtagaatat aagaacatta gttttacagt atgggatgta ggtggtcaag 240

ataaaattag gccattgtgg agacactatt tccaaaacac acaacgccta attttcgtag 300

tagacagtaa ccacacggaa actctcccta tagtgagtcg tatta 345

<210> 69
<211> 456
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 69
tcgcgggtcg atacaagcgt ctaaacacac gttctgatga catcaatttc taaaaatgtt 60

cgcaaattcc taccaaagcg gcttcatttc aatattctac agcgtaggaa gtaatccact 120

agcattatgg gacaagcagg taaagaacgg acatatcaga cggattatgg acgatgatgt 180

gaaatcatta gttttggaaa tatctggaac taatgtagct actacttata taacgtgccc 240

catcaaacca cgagcttcac ttggaatcag attacctttt ctgattatga ttataaagaa 300

tatgaagaag tactttacat ttgaaattca aatattagat gataaagata tgcgtagaag 360

gtttagaata tcaaatttcc aatcatccac caaagtgaga ccgttctgta caacgatgcc 420

aatgggactc agcagtggct ggaatcaagt tcaatt 456

<210> 70

<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 70
taatacgact cactataggg agacgggtcg atacaagcgt ctaa 44

<210> 71
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 71
taatacgact cactataggg agaagtccca ttggcatcgt tgta 44

<210> 72
<211> 472
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 72

taatacgact cactataggg agacgggtcg atacaagcgt ctaaacacac gttctgatga 60

catcaatttc taaaaatgtt cgcaaattcc taccaaagcg gcttcatttc aatattctac 120

agcgtaggaa gtaatccact agcattatgg gacaagcagg taaagaacgg acatatcaga 180

cggattatgg acgatgatgt gaaatcatta gttttggaaa tatctggaac taatgtagct 240

actacttata taacgtgccc catcaaacca cgagcttcac ttggaatcag attacctttt 300

ctgattatga ttataaagaa tatgaagaag tactttacat ttgaaattca aatattagat 360

gataaagata tgcgtagaag gtttagaata tcaaatttcc aatcatccac caaagtgaga 420

ccgttctgta caacgatgcc aatgggactt ctccctatag tgagtcgtat ta 472

<210> 73

<211> 503

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 73

cacgcgtcca aaatcaatcc ttgaaaaaag gcaacttcac ggaactttta caaaaactta 60

gtaaggttct aaaaccccag ggatacttat taagtgcagc agctccggga gcacgtgata 120

aaattgatga accttacgac attccagcga tttcaaagct actagacttg gtcaatgtta 180

tggttttcga tttccacggc gcttttgaca actatgtagg acatatctca ccgctttttc 240

ccgctaaagt tgactacgat tactataata ataaaacata caatgtggat acaggaattc 300

aatattggtt gaatggtggt gcagatcctg caaaattaaa cttgggtgtt gtcgcttatg 360

gaagaacttt tactttggct gataaaaata ataccgctct atatgctcct gtcaaaggtg 420

gaggtacagt tggaccttat tcacaacaat ctggatattt gggatataat gagatttgca 480

gatactatac cgactcaact tac 503

<210> 74
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 74
taatacgact cactataggg agacacgcgt ccaaaatcaa tc 42

<210> 75
<211> 47
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 75
taatacgact cactataggg agatcggtat agtatctgca aatctca 47

<210> 76
<211> 417
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 76
taatacgact cactataggg agacaaacat caggtgcgga aaaaacacga gaggctaata 60

ccaagtgatg ccgacgttgc caaatggaga tgtgttggtc ttctgtcagt cacaaccgca 120

aggcagtgtg aaatgtgaag ttatgtgatt tactttgaaa aaaacagata aggattacgt 180

aagatgagca attcatgtac tagtacaatt aaagttattg aaaataacac aattcttgta 240

gaatggcaaa aacatcatta tggtcatatt tttgattcgc aacatattaa tttacaaaag 300

aaagataata acataatagg ttcaaagcta atatcggagt cccatagcaa aggtaaaaaa 360

attgtttttc ttttttttct tacttaaaaa attctctccc tatagtgagt cgtatta 417

<210> 77
<211> 927
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 77
aggtaaatgc tcaacatgaa ggtgctagtg ttactctcgg tactatctgc atttcttgtt 60

tgccaaacat caggtgcgga aaaacgggtc gtttgttatt tcgccagttg gaccatttat 120

agagcaagaa aaggtgcttt cgatgtcagt aatatagatc catcgctgtg tacacacatt 180

aattttgctt tccttggtct taatgaagat ggttctattc acattttgga ttcctgggag 240

tcaagtgatg ctggtggtca tgagggtttt aaacatctcg tagagcttaa aaagaccaat 300

cctgacctta aggtatgtgt aagtatgggc ggttggaacg aaggttccaa gcagtattca 360

gcagtagcat cagatccagc aaaaagagta aaacttgcag atgaggtttt agcttttatc 420

gaaaattggg gcttcgatgg ttttgatttg gattgggaat atccaggatt acgaggagga 480

aacgaaacta ttgataaaga gaattatgtc gaacttttga aagctcttag tgacgttctt 540

gagcccaaag gatacttact cagtgtagcc actgcaggcg ccgttgaaaa aatcgacgtt 600

ggatttgacg tctcagttat aaatgagttg gtggatatga ttaacgttat ggtttttgat 660

tttcatggag catttgagaa ctttgtagga cacgtttcac cattgttccc agctcaagtt 720

gattacgaat atgaagctaa tagtacatac aatgtagaca caggaatcca acactggata 780

ttgagtggtg cagatcccgc aaaaataaac ctcggcattg tcacctatgg aagaacctat 840

accttagctg ataaaaccaa tacttctctt tatgcaaatg ttaccggtgg tggtaataca 900

gggccatatt ctgcacaatc tggatat 927

<210> 78
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 78
taatacgact cactataggg agacaaacat caggtgcgga aaaa 44

<210> 79
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 79
taatacgact cactataggg agacgggatc tgcaccactc aata 44

<210> 80
<211> 912
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 80
taatacgact cactataggg agacgggatc tgcaccactc aataatatta aaactactat 60

aaaaatatga ctagttattc agaagattta atcataatct aaaaaagtgc aatacatttt 120

taataaacta tgatttattt atcccgcggt aaacactaaa aacactatat attatacata 180

aagataaatt aatacagtca aatactatta atttattctc tgaagtacgg gccattactt 240

tgtttacatg tttgtatact aacctgtaga acgttattcc tgaagatttt ttattaacat 300

tgcttctgct actgcaacta cgttgagaac aagaagccat tattatgcac tatcacaata 360

tattattaca gtttctataa aagtattaaa aaactaaaaa tattcgaaag acaacaaacg 420

taaacaaaca tatacgatct gtcaaaagtg tcacaacaat cttaacgata tggccgaagt 480

gaggtcgttt ttagtcacgt gatgccttct ccatagattc taactcgatg gtgtagacgc 540

aaatagcgac atctgataat aaaatcgtga actaattttc gaaaccaaat tcagaatttc 600

gctttaatct gtgccttcta agaattgcaa ggcaagacag acgttgataa agatgttaga 660

tataagtttg atataagtag atataagttt gattattact tacaataggg acagcatcta 720

attatttta gcacactcac ttgctgccaa caatactggc cgcaaaacta ggtaatagag 780

aaatagtgta tattaaggaa tgaactgact ggtcgcaagc tcttgcttgt cggacctttc 840

cttacgaagt tgcttgacga ctgtattatt tttccgcacc tgatgtttgt ctccctatag 900

tgagtcgtat ta 912

<210> 81
<211> 342
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 81
ggagcgaagg catctctctc catcccgacc tctcgtggcc gccgcgaaga aaaggagctt 60

atcatggctt caaaacgtat cctgaaggaa ctgaaggact tgcagaaaga tcctccgaga 120

tcatgcagtg caggtccttc tggcgaggat atgttccatt ggcaggcaac aattatgggt 180

cctcctgata gtccctatgc tggaggtgtt ttcttagtga atatccattt ccccccggac 240

taccccttca agcctccgaa ggtatcgttc aagacaaagg tcttccatcc gaacatcaat 300

agcaatggag gcatatgcct cgacattctg aaggagcaat gg 342

<210> 82
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 82
taatacgact cactataggg agactctcca tcccgacctc tc 42

<210> 83
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 83
taatacgact cactataggg agatgcctcc attgctattg at 42

<210> 84
<211> 344
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 84
taatacgact cactataggg agactctcca tcccgacctc tcgtggccgc cgcgaagaaa 60

aggagcttat catggcttca aaacgtatcc tgaaggaact gaaggacttg cagaaagatc 120

ctccgagatc atgcagtgca ggtccttctg gcgaggatat gttccattgg caggcaacaa 180

ttatgggtcc tcctgatagt ccctatgctg gaggtgtttt cttagtgaat atccatttcc 240

ccccggacta ccccttcaag cctccgaagg tatcgttcaa gacaaaggtc ttccatccga 300

acatcaatag caatggaggc atctccctat agtgagtcgt atta 344

<210> 85
<211> 674
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 85
tcggcggccg gtaaggaact ttaaaccgga atggtcaaaa aacaaaatcc tggcataatg 60

gggaaaattg gaattaacgg ttttggccga attggccgcc tggtaccccg tgcagctctt 120

gaaaaaggag ttgaagtagt agctgtcaac gatcccttcc ttgatgtcga ctacatggta 180

tacttgttca aatttgactc tacccacggt cgctacaagg gatgtgtcaa cagtgatggc 240

aaaaacttag ttgttgatgg caaagtcatt tccgtacacc aagaaagaga cccagctgct 300

attccatggg gcaaagctgg tgcagattat gtagtagaat ctaccggagt gttcaccaca 360

attgaaaagg ccaagaaaca tcttgacggt ggtgctaaga aagtcatcat ctcagctcca 420

tctgctgatg ctccaatgta tgtatgtggt gttaacttgg atgcctacaa tccagctgat 480

cccgtaatct ctaacgcttc ttgcactacc aactgccttg ctccactcgc caaagtcatc 540

cacgacaact tcgaaatcgt tgaaggtttg atgaccaccg tacatgccac aaccgccaca 600

caaaaaactg tcgacggacc ctctggaaaa ttgtggcgtg acggtcgtgg tgccggacaa 660

aacatcatcc cagc 674

<210> 86
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 86
taatacgact cactataggg agagtacccc gtgcagctct tgaaa 45

<210> 87

<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 87
taatacgact cactataggg agaggttgtg gcatgtacgg tggtc 45

<210> 88
<211> 538
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 88
taatacgact cactataggg agagtacccc gtgcagctct tgaaaaagga gttgaagtag 60

tagctgtcaa cgatcccttc cttgatgtcg actacatggt atacttgttc aaatttgact 120

ctacccacgg tcgctacaag ggatgtgtca acagtgatgg caaaaactta gttgttgatg 180

gcaaagtcat ttccgtacac caagaaagag acccagctgc tattccatgg ggcaaagctg 240

gtgcagatta tgtagtagaa tctaccggag tgttcaccac aattgaaaag gccaagaaac 300

atcttgacgg tggtgctaag aaagtcatca tctcagctcc atctgctgat gctccaatgt 360

atgtatgtgg tgttaacttg gatgcctaca atccagctga tcccgtaatc tctaacgctt 420

cttgcactac caactgcctt gctccactcg ccaaagtcat ccacgacaac ttcgaaatcg 480

ttgaaggttt gatgaccacc gtacatgcca caacctctcc ctatagtgag tcgtatta 538

<210> 89
<211> 551
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 89
atagaagttg aaccatctga tactattgag aatgtgaaag ctaagatcca agataaggaa 60

ggtatcccac cagaccagca aagattgatc tttgcaggta aacagctgga agatggtaga 120

accttgtctg actataacat ccagaaagag tccactcttc acttggtact gagattgaga 180

ggaggtatgc agatcttcgt caagacacta actggaaaga ccatcacttt ggaagttgaa 240

ccatctgata ccattgagaa tgtcaaagct aagatccaag ataaggaagg tatcccacca 300

gatcagcaaa gattgatctt tgcaggtaaa cagctagaag atggtagaac tttgtctgat 360

tataacatcc agaaagagtc cactcttcac ttggtactta gattgagagg aggtatgcac 420

attttcgtca agacattgac tggtaatacc atcacattag aagttgaacc atctgatact 480

attgagaatg tgaaagctaa gattcaagat aaggaaggta tcccaccaga tcagcaaaga 540

ttgatctttg c 551

<210> 90
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 90
taatacgact cactataggg agagtatccc accagaccag 40

<210> 91
<211> 47
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 91
taatacgact cactataggg agaatgtgca tacctcctct caatcta 47

<210> 92
<211> 407
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 92
taatacgact cactataggg agagtatccc accagaccag caaagattga tctttgcagg 60

taaacagctg gaagatggta gaaccttgtc tgactataac atccagaaag agtccactct 120

tcacttggta ctgagattga gaggaggtat gcagatcttc gtcaagacac taactggaaa 180

gaccatcact ttggaagttg aaccatctga taccattgag aatgtcaaag ctaagatcca 240

agataaggaa ggtatcccac cagatcagca aagattgatc tttgcaggta aacagctaga 300

agatggtaga actttgtctg attataacat ccagaaagag tccactcttc acttggtact 360

tagattgaga ggaggtatgc acattctccc tatactgagt cgtatta 407

<210> 93
<211> 401
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<220>
<221> característica_misc
<222> (369). (369)
<223> n es a, c, g o t

<400> 93
gtaatgttca tgttttgtgt gtagaaaaac gctaaaactg tgtgcaggca catcctttcg 60

cgatgagtag acccaacaca aactgttttc aagtcttacc gaacaatagc agatggctat 120

cgacacaaga ttctggaatt tttcccaaac gtcacactga ctactatgta tttaatatgg 180

gaagacagga agtgttagtg gaaggatggt ggggaacaaa actgggatgg actggggttt 240

tggatggagt gaacctggcg cctggcaatg gttacagaat tgtagtcagt gataaaccat 300

attttgtaac agctgtgaaa ataacaaata aaacaactgt aagggctctc atgcattgtt 360

ctgagatana cggttatcct ctgcggagtc aaggaactga c 401

<210> 94
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 94
taatacgact cactataggg agatcgcgat gagtagaccc aacac 45

<210> 95
<211> 46
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 95
taatacgact cactataggg agaaacaatg catgagagcc cttaca 46

<210> 96
<211> 348
<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 96

taatacgact cactataggg agacgcgatg agtagaccca acacaaactg ttttcaagtc 60

ttaccgaaca atagcagatg gctatcgaca caagattctg gaatttttcc caaacgtcac 120

actgactact atgtatttaa tatgggaaga caggaagtgt tagtggaagg atggtgggga 180

acaaaactgg gatggactgg ggttttggat ggagtgaacc tggcgcctgg caatggttac 240

agaattgtag tcagtgataa accatatttt gtaacagctg tgaaaataac aaataaaaca 300

actgtaaggg ctctcatgca ttgtttctcc ctatactgag tcgtatta 348

<210> 97

<211> 1168

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 97

acgctgacaa gctgactcta gcagatcacc gtcttcgata ccaagcggcc tgaattcgcg 60

tgaatcgtat ctcagtccat cgttggccaa gccggagtcc aaataggtaa tgcctgctcg 120

ggagttgtac tcgcctggaa cagggcatcc aacctgacgg tcagatgcca tcagacaaga 180

ctgttggagg aggagatgac agtttcaaca cattcttcag tgaaactggt gccggcaaac 240

atgtacctag agcagtattt gtagatttgg aaccaacagt agtagatgaa gtacgtaccg 300

gcacataccg tcaattgttc cacccagaac aactcatcac tggcaaagaa gatgccgcca 360

ataactacta gaggtcacta tacaattggt aaagaaatag ttgacttggt attggacaga 420

atccgtaaat tggctgatca atgccatagt caacagatag acgttccatc aacaaagaag 480

tgaaaccaga tccagtacca ccaccgaagg agtggaagat caagaaacct tgaagtccag 540

tacattgatc agccaattta cggattctgt ccaataccaa gtcaactatt tctttaccaa 600

ttgtatagtg acctctagta gttattggcg gcatcttctt tgccagtgat gagttgttct 660

gggtggaaca attgacggta tgtgccggta cgtacttcat ctactactgt tggttccaaa 720

tctacaaata ctgctctagg tacatgtttg ccggcaccag tttcactgaa gaatgtgttg 780

aaactgtcat ctcctcctcc aacagtcttg tctgatggca tctgaccgtc aggttggatg 840

ccctgttcca ggcgagtaca actcccgagc aggcattacc tatttggact ccggcttggc 900

caacgatgga ctgagatacg attcacgcat tttggttgat gagtttttaa cttttacacc 960

acaaatgaaa caaaattacg acagacgttc agattagcta gtaatgcagc ggatccgatc 1020

gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga 1080

ttatcatata atttctgttg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga 1140

cgttatttat gagatgggtt tttatgat 1168

<210> 98
<211> 2131
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 98
tcgcggcgac acacacccct ctaaacacgc tatcattggt cccacgcgcc gctagctagc 60

gatcgcgagc gagcgcccgc ccccccgccc gggaagctgc attactagct aatctgaacg 120

tctgtcgtaa ttttgtttca tttgtggtgt aaaagttaaa actcatcaac caaaatgcgt 180

gaatgtatct cagtccatgt tggccaagcc ggagtccaaa tcggtaatgc ctgctgggag 240

ttgtactgcc tggaacatgg catccaacct gacggtcaga tgccatcaga caagactgtt 300

ggaggaggag atgacagttt caacacattc ttcagtgaaa ctggtgccgg caaacatgta 360

cctagagcag tatttgtaga tttggaacca acagtagtag atgaagtacg taccggcaca 420

taccgtcaat tgttccaccc agaacaactc atcactggca aagaagatgc cgccaataac 480

tatgctagag gtcactatac aattggtaaa gaaatagttg acttggtatt ggacagaatc 540

cgtaaattgg ctgatcaatg tactggactt caaggtttct tgattttcca ctccttcggt 600

ggtggtactg gatctggttt cacttctttg ttgatggaac gtctatctgt tgactatggt 660

aaaaaatcaa aactggaatt cgccatctac ccagctcctc aagtatctac tgctgtagta 720

gaaccataca actccatctt gaccacccac accactcttg aacactcaga ctgtgccttt 780

atggtagata atgaagccat ctatgacatc tgcagacgta atctagacat cgagcgccca 840

acctacacca acttgaacag acttattggc caaatcgtat cctcaatcac agcttctcta 900

agattcgatg gtgctctaaa tgttgacttg acagaattcc aaactaactt ggttccttac 960

cctcgtattc acttccctct tgtcacctat gccccagtaa tttccgctga aaaggcttac 1020

catgaacaac tttccgtagc tgaaatcacc aatgcctgtt tcgaacctgc caaccagatg 1080

gtaaaatgtg atcccagaca tggtaaatac atggcttgct gtatgttgta cagaggggat 1140

gttgtaccaa aggatgtaaa tgctgctatt gcaaccatta agaccaaacg taccatccaa 1200

ttcgtagact ggtgtccaac tggtttcaaa gtaggtatca actaccaacc accaactgtt 1260

gtacctggag gtgatttggc taaagtacaa cgtgccgtat gcatgttgtc caacactaca 1320

gctattgctg aagcctgggc aagattggac cacaaattcg atcttatgta tgccaagaga 1380

gctttcgtcc actggtatgt aggagagggt atggaagaag gtgaattctc tgaagctcgt 1440

gaagatttgg ctgctttgga gaaagattat gaagaagttg gtatggactc cggagaaggt 1500

gagggtgaag gagctgaaga atattaaatt tgattccaaa catgacaaat cacttgtttt 1560

taagacaaaa aattcctttc aatttttta cacttttca ttacttttct gtgaaacgat 1620

tatttaaagt ctgatttaat ttaatacaga atttttacg agcaaaaaaa aaaaagggcg 1680

gccccccgatt gcgcatatag ctacattaaa gatcgtggcc tctgtctaga gactgactac 1740

aagtatccat gattaaacgg agactgcaaa cagtgtaatc tcggttatca ataaccatcc 1800

aatgaactag tgcatgctgt agtatcataa cacgaagtaa gcatcttcac ttgaggaatg 1860

tattatactg tgtgagccaa tatcagtatg tgacaacact aaatgagact ggccatagat 1920

aaaacctaca gcgcctttag gacgacttcc tatactagaa tccggtggaa aaccagttcc 1980

tcaaagcact gctatctgca ggcatctgtc taacgtatgc aaatcttggt ggtaaagacg 2040

caaaggtaaa tcttgttata tatattgctg atcaagcgta tgatgatatg aagaaaccta 2100

tgggcgaata catgagatac agggatgaaa g 2131

<210> 99
<211> 1720
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 99
gacacgggcc cgaatatccc cggccgctct ctacgatcaa cgcatcgaag agagcgttct 60

gtgttttcta gtaatagtta tttaatacat tttataaatc aaaatgaggg aaatcgttca 120

catccaagct ggacaatgcg gtaaccaaat tggagccaaa ttctgggaaa tcatctctga 180

tgaacacgga atcgacccca ccggagccta ccatggagac tctgacctcc aacttgaaag 240

aatcaatgtc tactacaacg aggcctccgg cggaaaatac gtaccccgcg ccatcctcgt 300

cgacttggaa cccggtacca tggattcagt aaggtcgggt cccttcggac aaatcttcag 360

accagacaac ttcgtgtttg gacagtctgg agctggaaac aactgggcca agggacatta 420

cacagaaggt gctgaattag ttgattcagt attagatgtt gtaaggaaag aagctgaatc 480

atgtgattgt ttacaaggat tccaactcac acactcactt ggaggtggta ctggatcagg 540

tatgggtacc ctccttatct caaaaatccg tgaagaatac ccagacagaa ttatgaacac 600

atactcagta gtcccctcac ccaaagtatc agataccgta gtagaaccat acaatgccac 660

actttcagta catcaattgg tagaaaacac agatgaaaca tactgtattg ataatgaagc 720

tctctatgac atttgcttca gaactttgaa actcacaaca cccacatatg gagacttaaa 780

ccatttggta tccctcacaa tgtccggtgt aaccacctgt cttaggttcc caggtcagtt 840

gaatgctgat cttagaaaat tggctgtcaa catggttccc ttccccccgtc tccacttctt 900

catgcccgga ttcgctccac tcacctcaag aggcagccaa caatacagag cgttgacagt 960

tccagagctc acacagcaaa tgtttgatgc caagaacatg atggcggctt gtgatcccag 1020

acacggaagg taccttacag tagctgcagt attcagaggt aggatgtcaa tgaaagaagt 1080

tgacgaacag atgctcaaca tccagaacaa gaacagcagc tacttcgtcg aatggatccc 1140

caacaacgtt aaaacagccg tttgtgatat cccaccaaga ggtctcaaga tgtctgccac 1200

tttcatcggc aactcaaccg ccatccaaga attgttcaaa cgtatctccg aacaatttac 1260

agctatgttc aggaggaaag ctttcttgca ttggtacacc ggagaaggta tggatgaaat 1320

ggaattcacg gaagcagaat ccaacatgaa cgacttggta tcagaatacc aacagtacca 1380

agaagccaca gctgacgaag atgccgaatt cgacgaagac caggaagccg aagtcgacga 1440

gaactaaatt tcatacgtta attttggatc tgaaatcaaa gctttataac ttttatattt 1500

gtctcctctc cttttatttt ttatttaagc atgtttttg tacagtctct acattcccgt 1560

ttgtaaattt cgaatacact acttaaatta ttccaagact gacttttgt tgcttgtgtt 1620

tctggaattt caggaagtgt ttagatattt aacatgtttt gcgaactgtt tttttatgaa 1680

taggcattaa aactgctgcc attacttata ctcagaggca 1720

<210> 100
<211> 1175
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 100
tgacaactga cacacgagaa gatacgacat ggcaagaaaa tctctctgat taccattctg 60

acttttctgc gggatcggat gaggataagg aagacgatga tttcgatgag aagaacgacg 120

ccgatttaag cagaaggagt cgaagaaaga tggaaaggaa agacgagaag gatcgtcctt 180

taccaccgtt actagccaga gttggcggca atattgaagt actcggtttt aatgccaggc 240

agcgtaaagc gttccttaat gctattatgc gctacggaat gccaccacaa gacgctttca 300

attcacagtg gctggtgaga gatcttcgag gaaaatctga gaagatattc aaggcttacg 360

tgtctctctt tatgaggcat ctttgcgaac ctggtgcaga taatgctgat acatttgcgg 420

acggtgtgcc gagggaagga ctgagtaggc aacatgtttt gacaaggatt ggtgtgatgt 480

cacttataag aaagaaggtt caggagttcg aacacatcaa cggcgagtat agcatgccgg 540

aagtaatcaa aaagagcatt atggatcaaa ataaaatcaa tgccgccggc accgccacca 600

caagcgaagc agaaacgcct aaaagtgcta ctaccagtac tagtgctacg ccagctacaa 660

gtgctgctcc cagtcccgct cccacacaag gagaagataa agataaggat aaagattccg 720

ttcagagtga cgaaaataaa gataaagaag tggttaataa aacggaaacc gaagatgaag 780

agaagaaaac gggagaatct tcaacagaaa agccgaaaac tgaaccggaa gaagtgaaag 840

aagcttctcc gaaaaccgaa attcccgaag ctagttccga agctgataaa tctgagatca 900

aatccgaagt cgatacctcg tctgtaacca gcgaggaaaa gaaagaagag aaagaggaag 960

aggccaaaaa ggaagaaccc gaagagacca aaatggaaat acaggaggag gaacttgtta 1020

aagaggagaa aaaagaagaa gaggatgata agaagaagga ggaaattaag aaagaggtgg 1080

aaaagaagga agaggatgac gttatggtta ttgatgatga taaagataag aaggacaaaa 1140

aggaaatcga tctcgaagcc aagaagcgtt tcatg 1175

<210> 101
<211> 1176
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 101
cccatgcggc cgcccatttt tattgagcaa attgttcaga aagttgctgg gcgtagtcgg 60

gaaaaacatt gtttaaatcc ctttaatttc ctctaagtcg aaagaaaaag gctcaaaatg 120

gctctcagcg acgcagatgt acaaaagcag atcaagcaca tgatggcttt cattgagcaa 180

gaagccaatg aaaaggccga ggaaattgat gcaaaggctg aagaagaatt caacatcgaa 240

aagggccgtc tggtccaaca acagaggctc aagattatgg agtactacga gaaaaaagag 300

aagcaagtag aactccagaa aaaaatccaa tcatcaaaca tgttgaacca ggcaagattg 360

aaggtattga aagtaaggga agaccatgta cgtgccgttt tggaagatgc tcgcaaacgt 420

cttggtgagg taaccagaga ttcaggcaaa tatacacaaa tcctggaaag tctcatcctc 480

caagggctct atcagctctt cgaaaaggac atcaccatta gagtacgccc tcaggacaga 540

gaattggtaa aatctatcat gcctaacgtc tcccaaaagt acaaggacat aaccggtaaa 600

gacgtaaatc taaaaatcga cgacgagagc cacctttctc aagaaaccac cggaggaatc 660

gaactgttgg ccttgagaaa caagatcaaa atcaacaata ctctggaagc ccgtcttgag 720

ctcatctcac aacaattgat tccccagatc cgtaatgctc tgttcggacg caacgtcaac 780

agaaaattca ctgattaagt atttttgga tactgtgtat tgcctgtatt ttatatagta 840

ttgtaaaaca ttgttggttg cttagacaga tcttcaaaaa ccttttaaac tactatgtat 900

atacgatata tataataaac cattcctttt tttgaagtat tttaaacagt taagtttgtt 960

gttaccctaa ttgtatcctt gtcaagcaga tatttttaa aatccttaga aaattattag 1020

gtttcagtta tactacctta ttttttttct caaatatatt catattttat gtttatatgt 1080

atataaaaaa attatttttt tcttgtgaga aaatcatcgc aataaaattt attgttagtc 1140

caacaaaaaa aaaatggtgg ccgctttgtt ttttat 1176

<210> 102
<211> 2410
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 102
cggacgcgtg ggggagaaac ataacatcca tccacaaata tgtcgaaagt aaggatcgga 60

gatgaagaga aggaagggca gtatggttat gtccatgctg tctcaggtcc agtcgttact 120

gctgagaaaa tgtctggttc tgctatgtac gaactggtac gtgtcggata ctatgagctg 180

gtaggagaaa tcattagatt ggaaggtgac atggctacta ttcaggtata cgaagaaaca 240

tcaggtgtaa ctgttggtga tccagtatta agaactggta aaccactttc agtagaactt 300

ggacctggta ttatgggttc catttttgat ggtatccaac gtccattgaa agacatttgt 360

gacgctactg atagtattta catccccaag ggtattaacg taccttcttt atcgagaaca 420

gcaaaatggg acttcaaccc aatcaacatc aagttgggat ctcacttaac tggaggtgat 480

atatatggtc tagttcatga aaacaccctt gtcaaacaca aaatgattct gcctcctaga 540

gctaagggta ctgtaaccta cattgcagaa ccaggaaact acactgttga tgaagtagta 600

ttggaaactg aatttgatgg tgatcgtacc aaatatacta tgttgcaagt atggcctgta 660

cgtcaagcaa ggccagtcag tgaaaaatta cctgccaacc atcctctgct tacaggacag 720

cgtgtacttg atgctctttt cccatgtgta cagggtggta ctactgccat tcccggagct 780

ttcggttgtg gaaaaactgt aatttcacaa tctctttcca aatattccaa ctctgatgtc 840

attatctacg tcggttgcgg agaaagaggt aacgaaatgt ctgaagtatt gagagatttc 900

cctgaattga ctgttgaaat tgacgggcac actgaatcta ttatgaaacg taccgcattg 960

gtcgccaaca catctaacat gcctgtagct gctcgtgaag cttctatcta tactggtatt 1020

actctttctg aatacttccg tgatatgggt tacaacgtat ctatgatggc tgactcgaca 1080

tcacgttggg ccgaagcttt gagagaaatt tcaggtcgtt tggctgaaat gcctgccgat 1140

tccggttatc cggcttactt aggtgcccgt ttggcttcct tctacgaacg tgctggtcgc 1200

gttaaatgtt taggtaatcc agacagagaa ggatccgttt caattgtagg agccgtatca 1260

cctcctggtg gtgatttctc agatcctgtt accactgcta ctcttggtat tgtacaggtg 1320

ttctggggtt tggacaagaa acttgcccaa cgtaagcact tcccttcagt agactggctt 1380

ggatcatatt ccaaatattt aagagcattg gacgactttt atgacaaaaa cttccaagag 1440

tttattcctc ttagaaccaa agttaaggaa attcttcagg aagaagatga tctagccgaa 1500

attgtgcagc tggtaggtaa agcatctctg gcagaaacgg acaaaatcac cttggaaatt 1560

gccaggcttc ttaaagaaga tttcttgcaa caaaactcat actcttctta tgacagattc 1620

tgtccattct ataaaactgt cggtatgttg agaaacatga tcggtttgta cgacatggcg 1680

agacacgctg tagaatcaac cgcacaatca gaaaataaga tcacttggaa cgtaataaga 1740

gattcaatga gtggaatttt atatcaactt agcagtatga aatttaagga tcccgtaaaa 1800

gatggtgaag ctaaaatcaa ggcagatttt gatcaattat atgaagatat tcagcaggcc 1860

ttcagaaact tagaagatta aatcttttta aggaaatttt cctattttgt tcatcagtgt 1920

aagtttaaaa atatagcgat atttatcaaa aagaataata aggcctctat ccctcacttc 1980

tgtgaatatt aatatggccg tactaaagat agtaactaaa gataggtttt ctcttttttg 2040

atattatcct gtacaaaata aattatgtaa attgttgaat atgtgtatag ttttttggg 2100

tgagggtaca gtgcttatta aatacttttt aaacattttt cccgccattc caattactat 2160

taagtttttt cgttttaata ctttttaaa tatacaggtg cttaatatcg tttatatttt 2220

cagtattact tggttttctt catgtaaatt gttttaaatt tttcttttac ccttttaatc 2280

ttgtatatta cattacccaa ttaaagttaa ttgtacagat taagataaac gagtatctta 2340

taacatctat tagattgtta gaatcaataa atgtagtgta attgttctgt tttgaacaaa 2400

taaatgcatc 2410

<210> 103
<211> 1575
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 103
atctgacagt ttctacagta tagttgcagt gttcagtgga aaatattcaa ttaagatatt 60

cctagcgttc agacgtgtgc tctgatttca tggtactaaa atggcagtag ttcaatcaaa 120

ttacattcaa aatatacctt cttttggatg tgtagaccaa cctgacaacg gctccaaaac 180

aacaagagaa tcattagtag aagtgtcttc atcacgtcca cgccaagaag actactcagt 240

atatgagaac agactggcat ctttcactaa ctggcccaac acccaagtgt caagagaatc 300

attagctcga gctggtttta tatatacagg tcaagatgac atcgttatct gccctatttg 360

taagatagag ggataccatt gggtatcagg agacaatcca atggatgatc atcgtgtttg 420

gaatcccaac tgccccttc ttaatagaag agataacatc gagcacgatc actctgtagg 480

ttctagagac acttgtggac tttttggcat agaattgtta ccaaattcag ttcctgaaga 540

taatacaagt aatttacaaa aattagggat ccaacctgga acaggtccac aaaatcaaga 600

caaaattacg ttagaaagcc ggttagcaac attccagggt tggccaaaga gcattaaaca 660

gaggccttct gagttagctg aggcgggatt ttattacaca ggagctgggg accaaactgt 720

gtgcttttat tgtggtgggg gattaaaaga ctgggatgaa ggagatgatc cttgggagca 780

acatgccctt tggtttagca aatgtgtgtt tctcaatttg aaaaagggca aagaattcat 840

cgatcaagta aagaggaagg ctgatccaca attttcaatt cctggaccta gcggtactca 900

agccaaagag gaaccgactg ctactgaatc ttcaagtgat aaacaaagtg aaacagtgaa 960

aacaaaatca gatagggaaa gtttcgcaac tgacacaact ttgtgcaaaa tttgctttaa 1020

aaacgaactt ggtgttgttt tcttgccttg tggacatatt gttgcttgtg tagattgtgc 1080

tgctgcacta aaaacatgtg ctgtatgccg aaaaccttta gaggccacag tcagagcgtt 1140

cctatcataa atttttattc tgttaatagt ttttcacatt tcatgtttca cacatactta 1200

gatctagtca agattgttag agttttggca aagaaattaa ataaaaattc ttttcataaa 1260

aatcatttct ttaatattac attagagaaa aattatattt ttatactgag tacaaatttg 1320

aacaagttat taattttaag ttacaaaata cgcttttata ggttaacaat tatcaaagcg 1380

cttaaatcta atagatacta cacaacatta aggactgcaa accatatctt tcacgaagta 1440

atccctacta gtgaccaatt gctcgctagg agcagatgca aattacacaa atttactata 1500

aatctgacat taaaacttag gtgtatgttt gtgtgtatgt tatgtattga tcataataat 1560

atagtaattt ataat 1575

<210> 104
<211> 1870
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 104
gtcgacccac gcgtccgaat ttgatggtga tcgtaccaaa tatactatgt tgcaagtatg 60

gcctgtacgt caagcaaggc cagtcagtga aaaattacct gccaaccatc ctctgcttac 120

aggacagcgt gtacttgatg ctcttttccc atgtgtacag ggtggtacta ctgccattcc 180

cggagctttc ggttgtggaa aaactgtaat ttcacaatct ctttccaaat attccaactc 240

tgatgtcatt atctacgtcg gttgcggaga aagaggtaac gaaatgtctg aagtattgag 300

480

agatttccct gaattgactg ttgaaattga cgggcacact gaatctatta tgaaacgtac 360

cgcattggtc gccaacacat ctaacatgcc tgtagctgct cgtgaagctt ctatctatac 420

tggtattact ctttctgaat acttccgtga tatgggttac aacgtatcta tgatggctga 480

ctcgacatca cgttgggccg aagctttgag agaaatttca ggtcgtttgg ctgaaatgcc 540

tgccgattcc ggttatccgg cttacttagg tgcccgtttg gcttccttct acgaacgtgc 600

tggtcgcgtt aaatgtttag gtaatccaga cagagaagga tccgtttcaa ttgtaggagc 660

cgtatcacct cctggtggtg atttctcaga tcctgttacc actgctactc ttggtattgt 720

acaggtgttc tggggtttgg acaagaaact tgcccaacgt aagcacttcc cttcagtaga 780

ctggcttgga tcatattcca aatatttaag agcattggac gacttttatg acaaaaactt 840

ccaagagttt attcctctta gaaccaaagt taaggaaatt cttcaggaag aagatgatct 900

agccgaaatt gtgcagctgg taggtaaagc atctctggca gaaacggaca aaatcacctt 960

ggaaattgcc aggcttctta aagaagattt cttgcaacaa aactcatact cttcttatga 1020

cagattctgt ccattctata aaactgtcgg tatgttgaga aacatgatcg gtttgtacga 1080

catggcgaga cacgctgtag aatcaaccgc acaatcagaa ataagatca cttggaacgt 1140

aataagagat tcaatgagtg gaattttata tcaacttagc agtatgaaat ttaaggatcc 1200

cgtaaaagat ggtgaagcta aaatcaaggc agattttgat caattatatg aagatattca 1260

gcaggccttc agaaacttag aagattaaat ctttttaagg aaattttcct attttgttca 1320

tcagtgtaag tttaaaaata tagcgatatt tatcaaaaag aataataagg cctctatccc 1380

tcacttctgt gaatattaat atggccgtac taaagatagt aactaaagat aggttttctc 1440

ttttttgata ttatcctgta caaaataaat tatgtaaatt gttgaatatg tgtatagttt 1500

ttttgggtga gggtacagtg cttattaaat actttttaaa catttttccc gccattccaa 1560

ttactattaa gttttttcgt tttaatactt ttttaaatat acaggtgctt aatatcgttt 1620

atattttcag tattacttgg ttttcttcat gtaaattgtt ttaaattttt cttttaccct 1680

tttaatcttg tatattacat tacccaatta aagttaattg tacagattaa gataaacgag 1740

tatcttataa catctattag attgttagaa tcaataaatg tagtgtaatt gttctgtttt 1800

gaacaaataa atgcatcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaggaaaaa aaaaaaaaaa 1860

gggcggccgc 1870

<210> 105
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 105
ctaatagatg ttataagata ctcg 24

<210> 106
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 106
cgagtatctt ataacatcta ttag 24

<210> 107
<211> 23
<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 107

gtaatactga aaatataaac gat 23

<210> 108

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 108

atcgtttata ttttcagtat tac 23

<210> 109

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 109
agcactgtac cctcacccaa 20

<210> 110
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 110
ttgggtgagg gtacagtgct 20

<210> 111
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 111
gtgagggata gaggccttat t 21

<210> 112
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 112
aataaggcct ctatcccctca c 21

<210> 113
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 113
aacttacact gatgaacaa 19

<210> 114
<211> 19
<212> ADN

<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 114
ttgttcatca gtgtaagtt 19

<210> 115
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 115
aggcctgctg aatatcttca 20

<210> 116
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 116
tgaagatatt cagcaggcct 20

<210> 117
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 117
ctgccttgat tttagcttca c 21

<210> 118
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 118
gtgaagctaa aatcaaggca g 21

<210> 119
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 119
gattgtgcgg ttgattctac 20

<210> 120
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 120
gtagaatcaa ccgcacaat 19

<210> 121
<211> 43
<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 121

taatacgact cactataggg tacgtaagct tggatcctct aga 43

<210> 122

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 122

taatacgact cactataggg tgcaggtacc ggtccggaat tccc 44

<210> 123

<211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 123
taatacgact cactataggg cgcgtccgaa tttgatggtg a 41

<210> 124
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 124
taatacgact cactataggg gttacctctt tctccgcaac c 41

<210> 125
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 125
taatacgact cactataggg gaagtattga gagatttccc t 41

<210> 126
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 126
taatacgact cactataggg ggaatcggca ggcatttcag c 41

<210> 127
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 127
taatacgact cactataggg gcttacttag gtgcccgttt g 41

<210> 128
<211> 40
<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 128

taatacgact cactataggg ataaaagtcg tccaatgctc 40

<210> 129

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 129

taatacgact cactataggg ccaagagttt attcctctta 40

<210> 130

<211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 130
taatacgact cactataggg gctatatttt taaacttaca c 41

<210> 131
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 131
taatacgact cactataggg gaataataag gcctctatcc 40

<210> 132
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 132
taatacgact cactataggg taaacgatat taagcacctg 40

<210> 133
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 133
taatacgact cactataggg acatttttcc cgccattcca 40

<210> 134
<211> 39
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 134
taatacgact cactataggg gatgcattta tttgttcaa 39

<210> 135
<211> 36
<212> ADN

<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 135
gcgtagaatt cgttcaaaac agaacaatta cactac 36

<210> 136
<211> 56
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 136
taatacgact cactataggg gcgtagaatt cgttcaaaac agaacaatta cactac 56

<210> 137
<211> 53
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 137
ggccttaagc tagcgcaatt ggatcccatt tattgattct aacaatctaa tag 53

<210> 138
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 138
ggccttaagc tagcgcaatt ggatcc 26

<210> 139
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 139
gatggtgaag ctaaaatcaa ggcag 25

<210> 140
<211> 53
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 140
ctgccttgat tttagcttca ccatcggaaa ttttcctatt ttgttcatca gtg 53

<210> 141
<211> 608
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 141
gcgtagaatt cgttcaaaac agaacaatta cactacattt attgattcta acaatctaat 60

agatgttata agatactcgt ttatcttaat ctgtacaatt aactttaatt gggtaatgta 120

atatacaaga ttaaaagggt aaaagaaaaa tttaaaacaa tttacatgaa gaaaaccaag 180

taatactgaa aatataaacg atattaagca cctgtatatt taaaaaagta ttaaaacgaa 240

aaaacttaat agtaattgga atggcgggaa aaatgtttaa aaagtattta ataagcactg 300

taccctcacc caaaaaaact atacacatat tcaacaattt acataattta ttttgtacag 360

gataatatca aaaaagagaa aacctatctt tagttactat ctttagtacg gccatattaa 420

tattcacaga agtgagggat agaggcctta ttattctttt tgataaatat cgctatattt 480

ttaaacttac actgatgaac aaaataggaa aatttcctta aaaagattta atcttctaag 540

tttctgaagg cctgctgaat atcttcatat aattgatcaa aatctgcctt gattttagct 600

tcaccatc 608

<210> 142
<211> 533
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 142
ggccttaagc tagcgcaatt ggatcccatt tattgattct aacaatctaa tagatgttat 60

aagatactcg tttatcttaa tctgtacaat taactttaat tgggtaatgt aatatacaag 120

attaaaaggg taaaagaaaa atttaaaaca atttacatga agaaaaccaa gtaatactga 180

aaatataaac gatattaagc acctgtatat ttaaaaaagt attaaaacga aaaaacttaa 240

tagtaattgg aatggcggga aaaatgttta aaaagtattt aataagcact gtaccctcac 300

ccaaaaaaac tatacacata ttcaacaatt tacataattt attttgtaca ggataatatc 360

aaaaaagaga aaacctatct ttagttacta tctttagtac ggccatatta atattcacag 420

aagtgaggga tagaggcctt attattcttt ttgataaata tcgctatatt tttaaactta 480

cactgatgaa caaaatagga aaatttccga tggtgaagct aaaatcaagg cag 533

<210> 143
<211> 1114
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 143
cgtagaattc gttcaaaaca gaacaattac actacattta ttgattctaa caatctaata 60

gatgttataa gatactcgtt tatcttaatc tgtacaatta actttaattg ggtaatgtaa 120

tatacaagat taaaagggta aaagaaaaat ttaaaacaat ttacatgaag aaaaccaagt 180

aatactgaaa atataaacga tattaagcac ctgtatattt aaaaaagtat taaaacgaaa 240

aaacttaata gtaattggaa tggcgggaaa aatgtttaaa aagtatttaa taagcactgt 300

accctcaccc aaaaaaacta tacacatatt caacaattta cataatttat tttgtacagg 360

ataatatcaa aaaagagaaa acctatcttt agttactatc tttagtacgg ccatattaat 420

attcacagaa gtgagggata gaggccttat tattcttttt gataaatatc gctatatttt 480

taaacttaca ctgatgaaca aaataggaaa atttccttaa aaagatttaa tcttctaagt 540

ttctgaaggc ctgctgaata tcttcatata attgatcaaa atctgccttg attttagctt 600

caccatcgaa attttcctat tttgttcatc agtgtaagtt taaaaatata gcgatattta 660

tcaaaaagaa taataaggcc tctatccctc acttctgtga atattaatat ggccgtacta 720

aagatagtaa ctaaagatag gttttctctt ttttgatatt atcctgtaca aaataaatta 780

tgtaaattgt tgaatatgtg tatagttttt ttgggtgagg gtacagtgct tattaaatac 840

tttttaaaca ttttcccgc cattccaatt actattaagt tttttcgttt taatactttt 900

ttaaatatac aggtgcttaa tatcgtttat attttcagta ttacttggtt ttcttcatgt 960

aaattgtttt aaatttttct tttacccttt taatcttgta tattacatta cccaattaaa 1020

gttaattgta cagattaaga taaacgagta tcttataaca tctattagat tgttagaatc 1080

aataaatggg atccaattgc gctagcttaa ggcc 1114

<210> 144

<211> 1125

<212> ADN

<213> Leptinotarsa decemlineata

<400> 144

ggtgacatgg ccaccatcca ggtatatgaa gaaacttctg gagtaacggt gggagatcct 60

gtgttgcgta ccggtaaacc tctatctgtg gaacttgggc caggtattat gggttccatc 120

tttgatggta tccaacgtcc gctgaaagac atctgcgaca tgacggaaag tatctacatt 180

cccaagggtg tgaacgtgcc ttcactctcc agaactatca aatgggaatt caacccaatc 240

aacatcaagt tgggatccca cttgacaggt ggagatattt atggtatggt ccacgaaaac 300

acccttgtta agcacaaaat gatcctccca ccaaaatcta agggaacagt tacatacgtg 360

gcagaaccag gaaactatac cgttgatgaa gttgtattgg aaactgaatt tgatggagaa 420

aggtcaaaat acactatgtt acaagtctgg ccagttcgac aggcaagacc tgttagtgaa 480

aaactcccag ccaatcaccc gcttctcaca ggacagcgtg tattggactc tcttttccca 540

tgtgtgcaag gaggaaccac tgctattccc ggtgctttcg gttgtggtaa aactgtaatt 600

tcccagtcac tttccaagta ttccaactct gatgtcattg tgtatgtagg ttgtggagag 660

agaggtaatg agatgtctga agtattgaga gatttccctg aactgactgt ggaaattggt 720

ggtgagaccg aatctatcat gaaacgtacc gccttggttg caaacacctc caacatgcct 780

gtcgctgccc gtgaggcttc tatttatact ggtattaccc tgtctgaata tttccgtgat 840

atgggttaca acgtttctat gatggctgac tctacatcac gttgggctga agctttgaga 900

gaaatttcag gacgtttggc tgaaatgcct gctgattccg gttacccagc ctatttgggt 960

gctcgtcttg cctctttcta tgaacgtgct ggtcgcgtca aatgtttggg taaccctgac 1020

agagaaggat cggtttctat tgtaggagca gtatctccac ccggtggtga cttttcagat 1080

cccgttactt cagcaacttt aggtatcgta caggtgttct ggggt 1125

<210> 145
<211> 1125
<212> ADN
<213> Spodoptera frugiperda

<400> 145
ggtgacatgg ccaccatcca ggtatacgaa gaaacatcag gcgtaactgt aggtgacccc 60

gtgctgcgta ccggcaagcc cctgtccgta gagctcggac ctggtatcct cggctccatc 120

tttgacggta tccagcggcc actgaaggac atcaacgagc tcacacagtc catctacatc 180

cccaagggtg tcaacgtacc ctgccttgga cgtgatgtct cctgggaatt caacccctg 240

aatgttaagg tcggctccca catcaccgga ggagacttgt acggtatcgt acacgagaac 300

acattggtta agcacaagat gttgatccca cccaaggcca agggtaccgt cacctacgtc 360

gcgccctccg gcaactacaa agtcactgac gtagtgttgg agacggagtt cgacggcgag 420

aaggagaagt acacgatgtt gcaagtatgg ccggtgcgcc agccccgccc cgtcactgag 480

aagctgcccg ccaaccaccc cctgctcacc ggacagagag tgctcgactc tctcttccct 540

tgtgtccagg gtggtaccac ggccatcccc ggcgccttcg gttgtggcaa gactgtcgtc 600

tcacaggctc tgtccaagta ctccaactct gacgtcatca tctacgtcgg atgcggtgaa 660

cgtggtaacg agatgtctga ggtactgcgt gacttccccg agctgacggt ggagatcgag 720

ggcatgaccg agtccatcat gaagcgtacc gcgctcgtcg ccaacacctc caacatgcct 780

gtagccgccc gagaggcttc catctacacc ggtatcaccc tctctgagta cttccgtgac 840

atgggttaca acgtgtccat gatggctgac tccacctctc gttgggccga ggctcttcgt 900

gagatctcag gtcgtctggc tgagatgcct gccgactccg gttaccccgc ctacctggga 960

gcccgtctgg cctcgttcta cgagcgtgcc ggacgcgtga agtgcctggg taaccccgac 1020

agggagggct ccgtgtccat cgtgggcgcc gtgtcgccgc ccggaggtga cttctccgac 1080

cccgtgacgg ccgccacgct gggtatcgtg caggtgttct ggggt 1125

<210> 146
<211> 1126
<212> ADN
<213> Agrotis ipsilon

<400> 146
ggtgacatgg ccaccatcca ggtatacgaa gaaacatcag gtgtaacagt gggcgacccc 60

gtactgcgta ctggcaagcc tctgtccgtg gaactgggtc ctggtatcct gggctccatc 120

tttgacggta tccagcgtcc tctgaaggac attaacgagc tcacacagtc catctacatc 180

cccaagggtg tgaacgtgcc cagtctatcc agggatatcg cctgggaatt tgagcccatg 240

aacctgaaga tcgggtccca catcactggc ggagacctgt acgccatcgt ccgcgagaac 300

accctggtga agcacaagat gttgatcccg cccaaggcca agggtaccgt cacatacatc 360

gcgcccgctg gcaactacca cgtcactgac gtggttctgg agacagagtt cgacggtgag 420

aaggagaagt acagcatgtt acaagtgtgg cccgtgaggc agccgcggcc ggtcgctgag 480

aagctccccg ccaaccatcc gctgctcacc gggcagaggg tactcgactc gctgttcccc 540

tgtgtgcagg gtggtacgac ggccatcccc ggagccttcg gttgcgggaa gactgtcatc 600

tcacaggcgt tgtccaagta ctccaactcc gatgtcatcg tctacgtcgg ttgcggagag 660

cgtggtaacg agatgtctga agtactgcgg gacttcccgg agctgaccgt agagatcggc 720

ggcgtcaccg agtccatcat gaagagaacc gcgctggtcg ccaacacatc caacatgcct 780

gtcgccgccc gagaggcttc catctatacc ggtatcactc tgtcggagta cttccgtgac 840

atgggctaca acgtgtccat gatggccgac tccacgtctc gttgggcgga ggccctccgt 900

gagatctctg gtcgtctggc cgagatgccg gcggactccg ggtacccggc ctacctggga 960

gcacgactgg cctccttcta cgagcgagcc ggacgagtca agtgtctggg taaccccgac 1020

agggaaggtt ccgtatccat cgtgggcgcc gtgtctcctc ccggcggaga cttctccgac 1080

cctgtgacgg ccgcgaccct gggtatcgtg caggtgttct ggggta 1126

<210> 147

<211> 1126

<212> ADN

<213> Helicoverpa zea

<400> 147

ggtgacacgg ccaccatcca ggtatacgag gaaacctcag gtgtaaccgt gggtgacccc 60

gtactccgta ccggcaagcc cctgtccgtg gagttgggcc ccggtatcct gggctccatc 120

tttgacggta tccagcgtcc cctgaaagac attaacgagc tcacacagtc catctacatc 180

cccaagggtg tgaacgtacc ctctctggct agggatgtca gctgggaatt cgttcccatg 240

aacgttaaga cgggctccca catcaccgga ggagacctgt acggtctggt gcacgagaac 300

acgctggtga agcaccgcat gctgatcccg cccaaggcca agggtaccgt cacatacatc 360

gcgcccgctg gcaactacaa agtcactgac gtagtgctgg agacggagtt cgacggcgag 420

agggagaagt acacgatgtt gcaggtgtgg ccggtgcgcc agccgcggcc cgtcaccgag 480

aagctccccg ccaaccatcc gctgctcacc ggacagaggg tgctcgactc actcttccct 540

tgcgtacagg gtggtacaac tgccatcccc ggagctttcg gttgcggcaa gactgtcatc 600

tcgcaggcgc tgtccaagta ctccaactcc gatgtcattg tgtacgtcgg gtgcggagag 660

cgtggtaacg agatgtccga agtactgcgt gacttccccg agctgacggt ggagatcgag 720

ggcgtgacgg agtccatcat gaagcgaact gccctcgtcg ccaacacctc caacatgcct 780

gtcgccgccc gagaggcttc catctacact ggtatcactc tatccgagta cttccgtgac 840

atgggttaca acgtgtccat gatggctgac tccacgtccc gttgggccga agccctgcgt 900

gagatctcgg gtcgcctggc ggagatgccg gccgactccg gctaccccgc atacctgggc 960

gctaggttag cttccttcta cgagagagcc ggacgcgtca agtgtctggg taaccccgac 1020

agggaaggtt ccgtatccat cgtgggtgcc gtatctcccc ccggaggtga cttctctgac 1080

cctgtaactg cggccacgct gggtattgtg caggtgttct ggggta 1126

<210> 148
<211> 1126
<212> ADN
<213> Ostrinia nubilalis

<400> 148
ggtgacacgg ccaccatcca ggtatacgaa gagacctcag gtgtgaccgt cggtgatccc 60

gtgctccgaa ccggcaagcc tctgtccgtc gagctgggtc cgggtatcct gggttccata 120

ttcgacggca tccagcgccc gctgaaggac atcaacgaac tgacgcagtc catctacatc 180

cccaagggag tcaacgtgcc ctgcctggcc aggaaccacg actgggagtt caacccgctt 240

aacgttaagg tcggctccca catcaccggc ggagacttgt acggtatcgt gcacgaaaat 300

accctggtga agcacaaaat gctgatgccg cccaaggcta aaggcaccat cacctacatc 360

gcgcctgccg gcaactacaa cgtcactgat gtggtgctgg agacagagtt tgacggcgaa 420

aagaactcct acaccatgtt gcaagtgtgg cccgtgcgcc agcccagacc ctgcactgag 480

aagctgcccg ccaaccaccc gctgctaact gggcagcgtg tgctggactc actcttcccc 540

tgtgtccagg gcggcaccac cgccatcccc ggcgccttcg gttgcggcaa gactgtcatc 600

tcgcaagcgc tgtccaagta ctccaactct gacgtcatcg tctacgtcgg ctgcggagag 660

cgtggtaacg agatgtctga ggtactgcga gacttccctg agctgagcgt ggagatcgac 720

ggcgtgacgg aatccatcat gaagcgcaca gcgctcgtgg ccaacacctc caacatgcct 780

gtggctgccc gtgaggcctc catctatact ggtatcaccc tatccgagta cttccgcgac 840

atgggttaca acgtgtcaat gatggcggat tccacatcgc gttgggcgga ggcgctgcgc 900

gagatctcgg gccgtctggc cgagatgccg gcggattccg gctacccggc ctacctgggc 960

gcccggctgg cctccttcta cgagcgagcg ggacgcgtga agtgtctcgg aaaccccgac 1020

agggaaggtt ccgtatccat cgtgggcgcc gtgtcgccac ccggaggaga cttctcggac 1080

ccggtgacgg cggcgaccct gggtatcgtg caggtgttct ggggta 1126

<210> 149
<211> 1125
<212> ADN
<213> Anthonomus grandis

<400> 149
ggtgacatgg ccaccatcca ggtatatgaa gaaacctcag gtgtaacagt aggcgaccct 60

gtcctaagaa cgggcaaacc tctgtcagta gaactgggac ctggtatcat gggttccatt 120

tttgatggta tccaacgtcc cttaaaagac attaacgact tgacccagtc catttacatc 180

cccaagggtg taaatgtgcc atgtctgtcc aggacagccc agtgggaatt caatcccgtc 240

cacatcaaga tgggttctca tttgaccgga ggcgacatct atggtatggt ccatgaaaac 300

actttggtga aacacaaaat gattttgcct ccaaaggcaa agggtactgt gacatatatc 360

gccgaggcag gcaactatac tgtggacgat gtggtacttg agaccgaatt cgacggagaa 420

cgcaccaaat acaccatgtt gcaagtgtgg cccgtacgtc aaccgagacc tgtgagcgaa 480

aaattgccgg ccaaccaccc actgctcacc ggacaacgtg tactcgattc acttttcccc 540

tgtgtgcaag gaggtaccac cgccatcccc ggcgctttcg gttgcggtaa aaccgtaatt 600

tcacaggcct tgtccaaata ttccaactcc gatgtcatca tttacgtcgg ttgcggtgaa 660

agaggtaacg aaatgtctga agtactacgt gacttcccgg agttaacggt cgaaatcgac 720

ggtgccaccg aatccatcat gaaacgtacc gctttggtgg cgaacacctc caacatgccc 780

gtggccgccc gtgaggcctc catttatacc ggaatcactt tgtccgagta tttccgtgat 840

atgggttaca acgtttcgat gatggccgac tccacctcac gttgggccga agccttaaga 900

gaaatttcag gtcgtttggc tgaaatgccc gccgattccg gttatcccgc ttacttggga 960

gcacgtttgg cctcgttcta cgaacgtgcc ggtcgcgtta agtgtttagg taatccggac 1020

agagagggct ccgtgtccat cgtaggcgca gtatcgccac ctggtggtga cttctcagat 1080

cccgtcactt ccgccacttt gggtatcgta caggtgttct ggggt 1125

<210> 150
<211> 1125
<212> ADN
<213> Tribolium castaneum

<400> 150
ggtgacatgg ccaccatcca ggtatacgaa gaaacttcag gtgttacggt gggtgatcca 60

gtcttacgaa ctggtaaacc cttgtcggtg gagctgggcc caggtattat gggttcgatt 120

tttgacggta tccagagacc gctgaaggac atcaacgagc tcacgcaaag tatttacatt 180

cctaagggtg ttaatgtgcc atcgttgtcg cgtacgacta agtgggagtt tgccccattg 240

aatatcaagt tggggtcaca tctgacaggc ggtgatattt acgggatcgt ccatgaaaac 300

actctcgtca agcataaaat gctgctgccg cccaaagcca aggggactgt cacatacgtc 360

gccgatcccg gaaattacac agtcgatgaa gtcgtcttgg agacggaatt cgacggcgag 420

aggaccaaat acaccatgtt gcaagtgtgg cctgtgcgtc agccccgccc tgtcagcgag 480

aaattgccag ccaatcaccc cctattaact ggtcaacgcg tactcgactc acttttcccg 540

tgcgtccaag ggggtaccac cgccattccc ggagctttcg gttgtggtaa gaccgtaatc 600

tcgcaatctc tctccaaata ttccaactct gacgttatca tttgcgtcgg ttgcggggag 660

cgtggtaacg aaatgtctga agtattgcgg gacttccccg aactgacagt cgaaatcgaa 720

ggccaaacag agtctatcat gaaacgtacc gctcttgtcg ccaacacctc taacatgcct 780

gtagccgccc gtgaggcttc aatttacacc ggtattacac tgtctgagta tttccgtgat 840

atgggttaca acgtgtcgat gatggccgat tccacctcgc gttgggccga agctttgaga 900

gaaatttccg gtcgtttagc tgaaatgccc gccgattctg ggtaccccgc gtatttgggg 960

gcccgtttgg cttcgtttta cgagcgtgca gggcgtgtta aatgcttggg taaccctgat 1020

cgtgaaggtt ccgtttctat tgtcggggcc gtatcgcccc ctggtggtga tttctctgat 1080

cccgtcacct cagctacctt gggtatcgta caggtgttct ggggt 1125

<210> 151
<211> 2860
<212> ADN
<213> Manduca sexta

<400> 151
ggttcgtctc atccatcttt ctcgtctcaa caggacacac agatagtaca aaatggcgag 60

caaaggcggt ttgaagacga tcgccaatga ggagaatgag gagaggttcg gatacgtgtt 120

cgccgtgtcc ggtcctgtcg taacagcgga gaagatgtcc ggatccgcta tgtacgagct 180

ggtgcgcgtc ggttacaacg agctggtggg agaaatcatc cgtcttgagg gtgacatggc 240

caccatccag gtatacgagg agacctcagg cgtcacagtc ggtgaccctg tgctgcgtac 300

cggcaagccc ttgtccgtgg aactcggccc cggtatcctg ggctccatct ttgacggtat 360

ccagcgtcca ctgaaggaca tcaacgagct cacacaatcc atctacatcc ccaagggtgt 420

gaacgtgccc tcgctcgcca gggaggttga ctgggaattc aacccccctca atgttaaggt 480

cggctcccac atcaccggcg gagacctgta cggtatcgtg cacgagaaca cgctcgtgaa 540

gcacaagatg ttgatgccgc cgcgcgccaa gggtaccgtc acctacatcg cgcccgccgg 600

caactacaaa gtcactgatg tagtgttgga gacagagttc gacggcgaga aggcgcagta 660

cacgatgttg caggtgtggc ccgtgcgtca gccccgtccc gtcaccgaga agctccccgc 720

caaccacccg ctgctcactg gacagagagt actcgactcc ctcttccccc gtgtccaggg 780

cggtaccact gccatccccg gagccttcgg ttgcggcaaa actgtcatct cacaggcgct 840

gtccaagtac tccaactctg acgtcatcat ctacgtcggt tgcggagagc gtggtaacga 900

gatgtctgag gtactgcgtg acttccctga gctgacggtg gagatcgagg gtgtgacgga 960

gtccatcatg aagcgtaccg ccctcgtcgc caacacatcc aacatgcctg tcgctgcccg 1020

tgaggcttcc atctacacag gaatcaccct ttccgagtac ttccgtgaca tgggttacaa 1080

tgtgtccatg atggctgact cgacctcccg ttgggccgag gctcttcgtg agatctcagg 1140

tcgtctagct gagatgcctg ccgattccgg ttaccctgcg tacctgggag cccgtctggc 1200

ctccttctac gagcgtgccg gtagagtcaa gtgtctcgga aaccctgaca gggaaggttc 1260

ggtgtccatc gtgggtgccg tgtcgccgcc cggaggtgac ttctcggacc ccgtgacggc 1320

ggccacgctg ggtatcgtgc aggtgttctg gggtctcgac aagaaactcg cgcagaggaa 1380

gcacttcccc tccatcaact ggcttatctc ttacagcaag tacatgcgtg ctttggatga 1440

cttttatgag aagaactacc ccgaattcgt gcccccttagg actaaggtca aggagatcct 1500

gcaggaggaa gaggacctgt cagaaatcgt gcagttggtc ggtaaagcct cgctcgccga 1560

gactgacaag atcaccctcg aggtcgccaa actgcttaaa gacgacttct tgcaacagaa 1620

cagctactcg tcatacgatc gattctgtcc gttctacaag accgtgggca tgcttaagaa 1680

catcatctcg ttctacgaca tgtcgcggca cgcggtggag tccacggccc agtccgacaa 1740

caaggtcacg tggaacgtga tccgcgacgc catgggcaac gtactctacc aactctcctc 1800

catgaagttc aaggacccag tgaaagacgg cgaggccaag atcaaggcag atttcgacca 1860

gctgttggag gatatgtccg ccgccttccg taacctcgag gactaagcac agccgtacta 1920

cagtacagta cagtagggag cgcccacgag ccgcgccgcg acatcctccg cagccgagag 1980

gacatcttta tcgacttgtt ttcatgttgt catttttatt ataatttatt gattaatatg 2040

aggatatatt ttttcgtatt ctattcacgt ccggagcgtt ttgagacagt tttttcgagt 2100

ctggagtgtt ttgcatttta tcgatattat cgagtgtcgg gcgtcgttaa ggcggtgctg 2160

ttagcgaggt atgcgttatg acacacgcat atatcgtaat aacagcgttg tttaaacggg 2220

tctgtgcgca ggcgcagttc gtgggcggtc gtgttgttat agtaattatg tagtgttaaa 2280

tatattacaa catcgattcc agaggatggt gtcgcgggct agaactccga cagcgcgaaa 2340

gcctacaaag ggcgtggctt gtaaacggca caataaggcc gactaacaat tctccgttat 2400

ttgaaatagc agttcaaaca cagtcgtcac agtggcggta gtccgaatgt ttggacctgg 2460

gttggtgttt ataaagttcg cccaatctat tgtaaatata taacaggttc gctgttctag 2520

cccgcgggcc gttacggcgt ttagttgttt tatgaaatct atttatgtac tatatcgatc 2580

ggtaaaccgt gatttataat caaatatcct cttgcattcc acgttgttgt tagaaatata 2640

gaattcaaaa cgtttgttgt tttcgagagc tttttacgct taatatggat gttcattcag 2700

tattaatata atgcgtacga gtacgcagta acaatagtca gcactaatat gtctactcgc 2760

tgtttgaaat tctgtgacgt tacgtgttga gaaattatta taaataataa taaaatattg 2820

taaacaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2860

<210> 152
<211> 3097

<212> ADN

<213> Aedes aegypti

<400> 152

caggttggcc agtctttcag tcagtcagtc ttgtgatacc attttgcttc gctcggtgtg 60

tggagtttgc atttttccca tcccatctct ctcgacaact gcagcaccta agagcagaag 120

gaagcagagc aggaggaacg gatcgtaaca atgtccaccc tgaagaagat ctccgatgag 180

gaccgcgagt ccaaattcgg atatgtgttc gccgtatccg gtcctgtcgt cacggccgag 240

cggatgtccg gttcggctat gtacgagttg gtccgcgtcg gttactacga gctggtcggt 300

gagatcatcc gtttggaagg tgacatggcc accatccagg tatacgagga aacctccggt 360

gtcaccgtcg gcgatcccgt gctgcgtacc ggcaagcccc tctccgtcga actcggtcca 420

ggtattatgg gtagcatctt tgacggtatc cagcgtccac tgaaggacat taacgaactg 480

accagctcga tctacatccc cgaagggtgt gaacattccc tgcttgtccc gtacaggagg 540

ctggggattc aacccccttga acgtaaaggg ttgggctctc acatcaccgg aagagatctg 600

tacggtttgg tgcacgagaa taccctggtc aagcacaagc tgttggtccc gccacgcgcc 660

aagggtacag ttcgttacat tgctccaccc ggaaattaca ccgtcgacga catcattctg 720

gagacggaat tcgacggtga gatcaacaag tggtctatgt tgcaggtgtg gcccgtgcgt 780

cagccacgtc cagtgactga gaagttgccc gccaatcatc ctctgctgac tggtcagcgt 840

gtgttggatt cgctgttccc ttgtgtccag ggtggtacca ctgccatccc cggagctttc 900

ggttgcggta agactgtcat ctcgcaggcc ctgtccaagt actccaactc cgatgtcatt 960

atctacgtcg gttgcggaga acgtggtaac gaaatgtctg aagtattgcg tgatttccct 1020

gagctgtcgg ttgagattga cggtgttacg gagtccatca tgaagcgtac cgcgctggtt 1080

gccaacacct ccaacatgcc tgtcgctgct cgtgaagctt ccatctacac cggtattacc 1140

ttgtccgagt acttccgtga tatgggttac aacgtatcca tgatggctga ctcgacctct 1200

cgttgggccg aagctcttcg agaaatttcc ggtcgtctgg ctgagatgcc tgccgattcc 1260

ggttatcctg cctacctggg tgcacgtttg gcctccttct acgagcgtgc cggtcgtgtc 1320

aagtgtctcg gtaaccctga acgtgaaggt tcggtgtcca tcgtcggtgc cgtatcgccc 1380

cctggtggtg atttctccga tcccgtcaca tccgccaccc tcggtatcgt acaggtgttc 1440

tggggtctgg acaagaaact ggcccagcgt aagcatttcc cctcgatcaa ctggttgatc 1500

tcctacagca agtacatgcg cgcccttgat gacttctacg ataagaactt ccaggagttt 1560

gtacccactg cgtacaaggt taaggagatc ctgcaggagg aagaagattt gtccgaaatt 1620

gtgcagctgg tcggtaaggc atcgctggca gaaaccgata agatcaccct tgaggtagcc 1680

aagctgctca aggatgattt cctgcagcag aactcgtact cggcgtacga tcgattctgt 1740

ccgttctaca agacggtcgg tcgtatgctg cgaaacatga tcggattcta cgatatggct 1800

cgccacgccg tcgaaaccac cgcccagtcg gagaacaaga tcacctggaa cgtgatccgt 1860

gactcgatgg gcaacatcct gtaccagctg tcgtcgatga agttcaagga cccgggaagg 1920

atggcgaaga agatcaaggc cgatttcgac caactgtacg aagacctgca gcaggcgttc 1980

cgcaacctgg aagattaaat tctcccgcac attcgtggtc tcttcaatgc gaaattcttg 2040

aacagtttat tgtttcagta acatagcaaa gaaatgttcg tagcatagtg caaacaaaac 2100

atcaaaatga gaaacacgaa acacagcaaa agtgtagggc cctccttggc atcatgataa 2160

accaacaaca tccattaagt aaaatgcttc taggtcacca ttttacaggc gtatttaggt 2220

ttaaacattt atttacacaa attattgcaa gaaaaagatt aagagaacaa atctataaag 2280

cgagtgtaac atatacattt agaaacggcg aaacactaca acaactacag aaccacacgg 2340

cagaacagaa acaaatttta gtaggtaagt gatattgcaa gtgttgtccg acggcgtagg 2400

aaaaggttag cgaacggaat aacgttcaat cggaaattgt cttcgaaagt ttccgcttgc 2460

atgcgtgtct caaatgcgaa taaaacgtat aaacaatcgt ggtgaaactt aacatcagtg 2520

atgatataat caaaggggat taaaatgaaa cacgtggaca aaagatctat aaagaaaaac 2580

tctcagctag aatagttcaa gacgtggcga agcgtatcat aaatagaata atatgtaaac 2640

cacggttaat gggaaaataa gaagaaactt tcgattgagt atgttataga aacttatcca 2700

tgtatgatgt ataaatcgct aattaatcgt ataagaaata acagaacaag ttttattata 2760

ggtgtaagcc aatcaagttg ttatatcagt ttaaatatta tttagtgaat atagttttac 2820

ttttaatttt gtagtgtcgt ttttccatcg gtaggatcgg aaacgagaat cgatgattga 2880

ttgactgttg acaaatgaaa tgaaagttaa atttattatg ctttttgtt tgtgtgaaca 2940

gaattgaaga gccgccgcgt cgtttcggtc aatgcaagcg accgacggct cgtatctgtc 3000

ctgtacattt ttgtcgatga gcagaaaata tatgagaata aaaccctcta aaaaattgca 3060

ttccgcgtaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 3097

<210> 153
<211> 2533
<212> ADN

<213> Drosophila melanogaster

<400> 153

cgaaaacacg cacacagact gcaagtgtgt tagataataa gtgcagcaca agtccacact 60

tgagtaaaat aatccctaaa aaagccgaat atcaattagt tttccaagga gcttgaaaaa 120

gtgcgtcgaa aaaacagaat aaagcaaaat gtccaacctt aagcgtttcg atgatgagga 180

gcgtgagtcc aaatatggac gtgtcttcgc tgtctccggt cctgtcgtca ccgccgaggc 240

catgtctgga tcagctatgt acgagttggt ccgcgtcggc tactacgagc tggtgggcga 300

gatcatccgt ctggagggtg acatggccac catccaggtg tacgaggaga cctctggcgt 360

aactgtcgga gatccggtgc tgcgtaccgg caagcctctt tccgtggagc tgggacccgg 420

tatcatgggc agcatctttg acggtatcca gcgtcccctg aaggacatta acgagctgac 480

cgaatccatc tacatcccca agggtgtgaa cgtgcccagt ttgtcccgcg tggccagctg 540

ggagttcaac cccctgaacg tcaaggtcgg ctcccacatc accggaggtg acctgtacgg 600

tctggtgcat gagaacactc tggtcaagca caagatgatt gtgaaccccc gcgccaaggg 660

aacagtgcgc tacatcgccc cctccggcaa ctacaaggtc gacgatgtcg tcctggagac 720

cgagttcgat ggagagatca ccaagcacac catgttgcag gtgtggccag tgcgtcagcc 780

acgtcccgtg accgagaagc tgcccgccaa ccacccccctg ctcaccggac agcgtgtgct 840

cgactcgctc ttcccctgtg tccagggcgg taccaccgcc attcccggag ctttcggttg 900

cggcaagact gtgatctcgc aggctctgtc caagtactcc aactccgatg tcatcatcta 960

cgtcggttgc ggtgagcgtg gtaacgagat gtctgaggta ctgcgtgact tccccgagct 1020

gtccgtggag atcgacggtg tcaccgagtc catcatgaag cgtaccgccc ttgtggccaa 1080

cacctccaac atgcctgtgg ctgctcgtga ggcctccatc tacactggta tcaccttgtc 1140

cgaatacttc cgtgatatgg gttacaacgt gtccatgatg gctgattcca cctcccgttg 1200

ggctgaggct cttcgtgaaa tttctggtcg tctcgctgag atgcctgccg attccggcta 1260

cccagcctac ttgggagccc gtctggcctc cttctacgag cgtgccggtc gcgttaagtg 1320

cttgggtaac cccgagcgcg agggatccgt gtccattgtc ggagctgtgt ctcctcctgg 1380

tggtgacttc tccgatcccg tgacctccgc cactctgggt atcgtgcagg tgttctgggg 1440

tctcgacaag aagttggccc agcgcaagca cttcccctcg atcaactggc tcatctccta 1500

ctcgaagtac atgcgtgctc tggatgactt ctatgacaag aacttccccg aattcgtgcc 1560

gctgcgtacc aaggtcaagg agatcctgca ggaggaggag gatctgtctg agatcgtgca 1620

actggtcggc aaggcctctc tggccgaaac cgacaagatc acgctggagg tggccaagct 1680

gctgaaggac gatttcctgc agcagaactc ctactcctcg tacgatcgct tctgcccctt 1740

ctacaagacc gtgggcatgt tgaggaacat catcgacttc tacgacatgg cccgtcactc 1800

cgtggagtct acggctcagt ctgagaacaa gatcacctgg aacgtgattc gtgaggcaat 1860

gggcaacatt atgtaccagc tgtcatccat gaagttcaag gaccccgtta aggatggtga 1920

ggccaagatc aaggctgact tcgagcagct gcacgaggac ctgcagcagg ccttcagaaa 1980

tctggaggac tagagaccgc gctggcccta cttttacact ctaatcttat atttgttata 2040

tagttaacgt ttaaaaatga aagcagtcaa aaaccatccg aaaaagccta atcaaacacc 2100

aacaattccg tgctgcattc gatgaaaaac aaaagtccaa caaataccac aacttcttgg 2160

tgcctgcgag agatgtaaac attccggcct gcggttaata ctttccccta accacgcccc 2220

ctccgccccc tgaagggcaa ctctaggcaa cagcaactac aacgtcctgc tatgtacttc 2280

catttacaac aacaacacca acatacactt gaataaaagt acacggacac tggcgcacac 2340

acaacacata cataaaagac acaaatacaa atgcatgcat aaatagtatt attgtttaat 2400

gaatggaaat tcttgtttat ttgtgaaaaa agtcatgttt tctccctgtt tgtttgttaa 2460

atttatgtaa atatttaaag tatgaaatat taaatgtacg aataaagtgc aacaacaaat 2520

acatttaatg taa 2533

<210> 154
<211> 603
<212> ADN
<213> Bombyx mori

<400> 154
atgagttccc tcaagctgca gaagaggctt gcagcctctg ttatgcgatg tggtaaaaag 60

aaggtgtggt tggatccaaa tgaaatcaat gagatcgcaa acaccaactc cagacagaac 120

atccgtaaga tgatcaagga tggtctcgtc atcaagaaac ctgtagcagt acactcccgc 180

gctcgtgtcc gcaaaaacac agaagcacgt agaaagggtc gtcactgtgg ctttggtaag 240

agaagaggta cagccaatgc gcgtatgcca cagaaggaac tatgggtaca aagacaaagg 300

gttttaagaa aattgctcct gaagtacaga actgccaaga agattgacag gcatctatac 360

cactcactct acatgaaggc gaagggtaat gtgttcaaga acaagcgtgt gctcatggag 420

tacatccaca ggaagaaggc tgagaaggcc aggacgaaga tgcttagcga ccaggctgag 480

gcccgccgca ataaagtgaa ggaggcacgc aagcgccgcg aggaacgtat tgccgccaag 540

aaggaggaac tgctgcagac cttcgctaga gaagacgaag ccgcgcttac cgctaagaag 600

taa 603

<210> 155
<211> 612
<212> ADN
<213> Drosophila melanogaster

<400> 155
atgagttctc taaagctcca gaagaggctc gcagcctccg tgctgcgatg cggcaagaag 60

aaggtctggt tggatcccaa tgaaatcaac gagatcgcta acacaaactc gcgtcagaac 120

attcgcaagc ttatcaagga tggtctgatc atcaagaagc ccgtcgtggt ccactcccgt 180

taccgtgtgc gcaaaaacac cgaggcccgc cgcaaggacc gtcactgcgg attcggaaag 240

cgtaagggta ctgcgaacgc ccgcatgcct accaagctgc tgtggatgca gcgccagccg 300

ttctgccgcc gcctgttgaa gaagtaccgc gacagcaaga agattgacag gcacctgtac 360

cacgacctgt acatgaagtg caagggtaac gtgttcaaga acaagcgcgt cctcatggag 420

tacatccaca agaagaaggc tgagaagcag cgcagcaaga tgctggctga tcaggccgag 480

gctcgccgac agaaggtgcg tgaggcccgc aagcgccgcg aggagcgtat tgccaccaag 540

aagcaggagc tcatcgccct gcatgctaag gaggacgaga tcgctgccaa ggccgccacc 600

gcgggtcact aa 612

<210> 156
<211> 567
<212> ADN
<213> Anopheles gambiae

<400> 156
atgcgatgcg gcaagaagaa ggtgtggttg gatcctaatg aaatcaacga gattggaaac 60

accaactcgc gacaaaacat tcgcaaactg atcaaggatg gtctgatcat caagaagccg 120

gtggtggtcc actcgcgtta ccgtgtgcgc aaaaacacga tcgctcgccg caagggtcgc 180

cactgcggtt atggtaagcg aaagggtacg gccaatgccc gtatgcccca gaagctgctc 240

tggatgaacc gtatgcgtgt gctgcgtcgt ctgctgaaga agtaccgtga ggcgaagaaa 300

atcgaccgtc acctgtacca cgacctgtac atgcgtgcga agggtaacgt gttcaagaac 360

aagcgtatcc tgatcgagca catccacaag aggaaggcgg agaaggcccg ctccaagatg 420

ctgagcgatc aggccgaagc caagcgtacc aaggttcgtg aggcccgtcg tcgtcgcgag 480

gaacgtattg ccaccaagcg ccaggagctt ctgcagacga tcgctaagga agaggagacc 540

gcgcagcatg ttgccgctac tggaaag 567

<210> 157
<211> 652
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 157
cacgttgaga ggtgcatttg cacgatgagt tccttaaaac ttcagaagag gctagcagcc 60

tctgttatgc gatgtggtaa aaagaaagta tggttggacc ctaatgaaat caacgaaatt 120

gccaacacta actcaagaca gaacatccgt aagttgataa aggatggtct tattattaag 180

aagcccgtag ctgtacattc ccgtgcccgt gttcgcaaaa acactgaagc ccgcaggaaa 240

ggaaggcact gcggttttgg taaaaggaag ggtactgcta atgcccgtac cccgcaaaag 300

gaattatgga ttcaacgcat gagagttttg cgtcgtctcc ttaaaaaata cagggaagct 360

aaaaaaattg acagacatct ataccactca ctctacatga aggccaaggg taacgtattc 420

aagaacaagc gtgtccttat ggaatacatc cacaagaaga aggcagagaa agcccgtgcc 480

aagatgttgg cagaccaggc caatgccaga aggatgaagg taaaacaggc tagagaaaga 540

cgtgaggaac gtatcgccac aaagaaacaa gaagttttgc agaactacat gagggaggat 600

gaagctgcgg ccactaagaa ataagttaat tgttttataa gatgactata tt 652

<210> 158
<211> 402
<212> ADN
<213> Anthonomus grandis

<400> 158
tgagatgtgg taagaagaag gtatggttgg accctaatga aattaacgag attgccaaca 60

ccaactcgag gcaaaacatc cgtaaattga tcaaggatgg tttgatcatt aagaaaccgg 120

tggcagtgca ctctagggct cgtgtccgta aaaacacaga agctcgcagg aagggaaggc 180

actgcggttt cggtaagagg aaaggtacag cgaacgctcg tatgcctcaa aaggaactat 240

ggatccaaag gatgcgtgtc ttgaggcgtc tcctgaaaaa atacagggaa gccaaaaaga 300

tcgacaggca tctgtaccac gccctgtaca tgaaggccaa gggtaacgtg ttcaagaaca 360

agagagtgtt gatggaatac atccacaaga agaaggctga ga 402

<210> 159
<211> 403
<212> ADN
<213> Tribolium castaneum

<400> 159
tgagatgcgg taagaagaag gtatggttag atccgaacga aatcaacgag atcgccaaca 60

cgaattcacg ccagaacatc cgcaaattga tcaaagatgg tctcatcatc aaaaagcccg 120

tcgctgtgca ctccagagcc cgcgtccgca agaacacgga ggcccgcagg aagggacgcc 180

attgcggctt cggcaagagg aaaggtacag ccaatgcgcg tatgccccag aaggagctct 240

ggatacagag gatgcgggtc ttgaggaggc tcctcaagaa gtatcgcgag gccaaaaaga 300

tcgacagaca tctttaccat tcgctgtata tgaaggccaa gggcaacgtc ttcaagaaca 360

agagggtcct tatggagtac atccacaaga ggaaggccga gaa 403

<210> 160
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 160
ggtgacatgg ccaccatcca ggt 23

<210> 161
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 161
accccagaac acctgyacra tacc 24

<210> 162
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 162
ttaatacgac tcactatagg gagaccagtg tgctggaatt cgcc 44

<210> 163
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 163
ttaatacgac tcactatagg gagaggatat ctgcagaatt cgcc 44

<210> 164
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 164
ttaatacgac tcactatagg gagacctgtc cgtagagctc ggacc 45

<210> 165
<211> 44

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 165
ttaatacgac tcactatagg gagaggcacg ctcgtagaac gagg 44

<210> 166
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 166
tgmgatgygg yaaraagaar gt 22

<210> 167
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>
<221> característica_misc
<222> (23) (23)
<223> n es a, c, g o t

<400> 167
tgmgatgygg yaaraagaar gtntgg 26

<210> 168
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<220>
<221> característica_misc
<222> (6) .(6)
<223> n es a, c, g o t

<400> 168
ttctcngcct tcytcytgtg gatgt 25

<210> 169

<211> 2713

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 169

cggacgcgtg agcggacgcg tgggcggacg cgtgggcgga cgcgtgggcg gacgcgtggg 60

cggacgcgtg ggcggacgcg tgggtggcaa cccacgcgtc cgctagttag tgctcgccgg 120

cgagcgcccg cgcccccgcc ccgaaagctg cattactagc taatctgaac gtctgtcgta 180

attttgtttc atttgtggtg taaaagttaa aactcatcaa ccaaaatgcg tgaatgtatc 240

tcagtccatg ttggccaagc cggagtccaa atcggtaatg cctgctggga gttgtactgc 300

ctggaacatg gcatccaacc tgacggtcag atgccatcag acaagactgt tggaggagga 360

gatgacagtt tcaacacatt cttcagtgaa actggtgccg gcaaacatgt acctagagca 420

gtatttgtag atttggaacc aacagtagta gatgaagtac gtaccggcac ataccgtcaa 480

ttgttccacc cagaacaact catcactggc aaagaagatg ccgccaataa ctatgctaga 540

ggtcactata caattggtaa agaaatagtt gacttggtat tggacagaat ccgtaaattg 600

gctgatcaat gtactggact tcaaggtttc ttgattttcc actccttcgg tggtggtact 660

ggatctggtt tcacttcttt gttgatggaa cgtctatctg ttgactatgg taaaaaatca 720

aaactggaat tcgccatcta cccagctcct caagtatcta ctgctgtagt agaaccatac 780

aactccatct tgaccaccca caccactctt gaacactcag actgtgcctt tatggtagat 840

aatgaagcca tctatgacat ctgcagacgt aatctagaca tcgagcgccc aacctacacc 900

aacttgaaca gacttattgg ccaaatcgta tcctcaatca cagcttctct aagattcgat 960

ggtgctctaa atgttgactt gacagaattc caaactaact tggttcctta ccctcgtatt 1020

cacttccctc ttgtcaccta tgccccagta atttccgctg aaaaggctta ccatgaacaa 1080

ctttccgtag ctgaaatcac caatgcctgt ttcgaacctg ccaaccagat ggtaaaatgt 1140

gatcccagac atggtaaata catggcttgc tgtatgttgt acagagggga tgttgtacca 1200

aaggatgtaa atgctgctat tgcaaccatt aagaccaaac gtaccatcca attcgtagac 1260

tggtgtccaa ctggtttcaa agtaggtatc aactaccaac caccaactgt tgtacctgga 1320

ggtgatttgg ctaaagtaca acgtgccgta tgcatgttgt ccaacactac agctattgct 1380

gaagcctggg caagattgga ccacaaattc gatcttatgt atgccaagag agctttcgtc 1440

cactggtatg taggagaggg tatggaagaa ggtgaattct ctgaagctcg tgaagatttg 1500

gctgcttttc ttatcatctc tatttttttt acgatcctta accgcataac accgtatcta 1560

tcattgtgaa attaggtgtg aaaggtgttt aaaaatgagg ttccttattc tacttgccgt 1620

attggctgta gctgtgaatg ctacatcaat ccaccaacaa tgggctacat ttaaggtaaa 1680

ccattccaag aagtacggac atcttaaaga agagcaagtt cgcttccaag ttttctctca 1740

aaatctccgc aaaattgaag aacacaatgc aagataccag aatggtgaag tgtccttcta 1800

cttgggggtt aatcagttcg cagatatgac ttcagaggaa ttcaaggcta tgcttgactc 1860

ccaactcatt cacaagccta agcgaaacat tacatcccgc tttgtagctg atcctcaatt 1920

gactgttcca gaatcaattg actggagaga aaaggggggca gttgctccca taagggacca 1980

agggcaatgc ggatcatgtt gggcatttag tgcagctggt gctcttgaag gacaaagatt 2040

tttaaagcag aacgtactag aagtactgag tacccaacag ttagtagatt gttccggtga 2100

ttacgacaat gaaggctgca atggtggttg gccccattgg gcatataact acattaaaga 2160

tcatggcctc tgtctagagt ctgattacaa gtatcaagga ttagacggtg actgcaaaca 2220

gtgtaatccg gttatcaaaa ccatcaatgg ctatgcatct gtagatcaaa ctgaagaagc 2280

acttaaggag gctgtaggta ctgctggccc aatatcagta tgtgtcaacg ctaattggga 2340

ctggcaactg tacagcgggg gtatccttga tagccaaagt tgtccaggcg gcattttaaa 2400

ccatgcagtt ttagctgttg gatatggttc agaaaatggt aaagactttt ggcttatcaa 2460

gaattcatgg gacacttatt ggggagaagc aggttatttg agattagtac gtggtacaaa 2520

ccagtgcggt atcaatgaag tggccgatta tcctctccta taattttaaa aattgtcatg 2580

ccttacagtt tatataatga aacatgaata aaaatattat aactttaaaa aaaaaaaaaa 2640

agggcggccg actttttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaca aaaaaaaata aaaaaaaaaa 2700

agggggggcc ccc 2713

<210> 170
<211> 1363
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 170
ccçacccgtc ccgtggtcga gaaaagtact aatagtgata tctacgtttt tcgtttgttt 60

aaaatgtagt gacatttctg ttaaagtctt caaaaacgga gacgtagtta atttaaatat 120

taactcaatt tctgagttaa agcaaaatgt agtccacaga ggtgaactag acgacattga 180

aattgaggac caaaatgttc cagtagtacc aaacaatttg ctgaatggaa tcactgccac 240

ggaacttcac attattagat cccaagtaag agatgttgaa cctggtgcat tcgatggagc 300

ttctatggtt aacctaatgt tgtatgaaaa ccaaattgca agaataagaa aaggtatatt 360

taacaaaaac tcatttaata tacttgcttt gcagaataac gttatatcta atatagaaga 420

tgaagccttt gacggtacaa ccatcgcgat actggacttt ggttttaaca agatggaaaa 480

attgacttca aaaatgttcg ctggttcaaa tattacaaat cttaacttac aatcgaacct 540

aataagtaac atagaagatg gtacctttca gaaaatcgat aatttgaata aattagactt 600

aagcggtaac caattggaag ttattggaca cgtctttaga aacctgacaa acctaaatga 660

attgcacttg gatggaaacc gaatcaaaac acttgaacct ggatgctttg gtggttctgg 720

gatctactgg ctttattttg caggtaacca actgactcat attgtaaagg gagtgtttta 780

taaagtacca gtatccttat tggatttcac taataacaaa atttcaaaaa ttgataaagg 840

agccttagct ggtctttcaa cgctaacatt tgttcagtta tctaataaca atataggaga 900

tttgaagctg tccactcttg gcgatctcaa tactgcttta aatggtctat ctttgagtga 960

taacggcatt tcaaatatcg atattggagt gttcaaaaat actaaaatcg atatgttgga 1020

cttaagcaaa aaccatataa aatcaattaa aaaaggactg ttccagaatg ttaaaatgta 1080

cactattaat ttgagtgaaa atgaaattac tgaaatagag gaagatgctt ttggtgatat 1140

cgaggattta agtcacatag atgtgagctt gaacaaactt acagaagtta agaagagaat 1200

gttcagtcta ccattggatg aagttaattg gaagataatg taataactaa aatcgataat 1260

gatgcccctc gtgtccttcc gctgtcacgt cttcagataa aaataatcct attggctgca 1320

agaacaaagc ttaaaataat ggtgtattta ataataatgg aat 1363

<210> 171
<211> 1215
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 171
aaaagagtga ggaaacaggt taattataat gacggaggaa tgacaactga cacacgagaa 60

gatacgacat ggcaagaaaa tctctctgat taccattctg acttttctgc gggatcggat 120

gaggataagg aagacgatga tttcgatgag aagaacgacg ccgatttaag cagaaggagt 180

cgaagaaaga tggaaaggaa agacgagaag gatcgtcctt taccaccgtt actagccaga 240

gttggcggca atattgaagt actcggtttt aatgccaggc agcgtaaagc gttccttaat 300

gctattatgc gctacggaat gccaccacaa gacgctttca attcacagtg gctggtgaga 360

gatcttcgag gaaaatctga gaagatattc aaggcttacg tgtctctctt tatgaggcat 420

ctttgcgaac ctggtgcaga taatgctgat acatttgcgg acggtgtgcc gagggaagga 480

ctgagtaggc aacatgtttt gacaaggatt ggtgtgatgt cacttataag aaagaaggtt 540

caggagttcg aacacatcaa cggcgagtat agcatgccgg aagtaatcaa aaagagcatt 600

atggatcaaa ataaaatcaa tgccgccggc accgccacca caagcgaagc agaaacgcct 660

aaaagtgcta ctaccagtac tagtgctacg ccagctacaa gtgctgctcc cagtcccgct 720

cccacacaag gagaagataa agataaggat aaagattccg ttcagagtga cgaaaataaa 780

gataaagaag tggttaataa aacggaaacc gaagatgaag agaagaaaac gggagaatct 840

tcaacagaaa agccgaaaac tgaaccggaa gaagtgaaag aagcttctcc gaaaaccgaa 900

attcccgaag ctagttccga agctgataaa tctgagatca aatccgaagt cgatacctcg 960

tctgtaacca gcgaggaaaa gaaagaagag aaagaggaag aggccaaaaa ggaagaaccc 1020

gaagagacca aaatggaaat acaggaggag gaacttgtta aagaggagaa aaaagaagaa 1080

gaggatgata agaagaagga ggaaattaag aaagaggtgg aaaagaagga agaggatgac 1140

gttatggtta ttgatgatga taaagataag aaggacaaaa aggaaatcga tctcgaagcc 1200

aagaagcgtt tcatg 1215

<210> 172
<211> 3363
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 172
accacgcatc cgcccacgcg tccgcccacg cgtccgccca cgcgtccgat tgaattactc 60

taatattttt tttttatttt catttttat ttatttaata atttaaacta ttttaacttt 120

aattataaac caaaatattt taaaactaaa aaaactaatt taaaattcaa ttgaaaatga 180

taataaattt attttcttct ttcgacccta catctaattt taatttacca ataaactgat 240

taagaacagt attaggtcta ttaattattc catctagatt ttgattaatc ccctctcgtt 300

ataattattt atgaataaag attattataa cattacataa agaatttaaa gttttaattg 360

gaaattataa atcccaagga agaacattaa tttttatctc actatttaga ttaattttat 420

ttaataattt tcttggatta ttcccgtata tttttactag aacaagacat ataactttaa 480

cattaagatt agctttacca ttatgattga gatttataat ttatggatga ataaataata 540

ctattcatat attagctcat ttagttcctc aaggaactcc tccgatttta ataccattta 600

tagtttgtat tgaaacaatt agaaatgtaa ttcgacctgg aacattagca gtacgtttaa 660

ctgctaatat aatcgcagga cacttattaa taactctttt aggaaatact ggaccaataa 720

tatcaatcta tatattaaat attttaatta ttgtccaact tttactatta attttagaaa 780

cagcagtatc tataattcaa tcttatgtat ttgctgtttt aagaacacta tattctagag 840

aagtaaatta atgtcaaatc ataaaaatca tccttatcat ttagtagata ttagaccatg 900

acctttatta ggagctttta gagcaatatt aacaatatta ggaataatta aatgatttca 960

tttatataat aataatttac taataattgg attattaatt acaagattaa ttatatatca 1020

atgatgacga gatattgtac gagaaggaac ttatcaaggc cttcatacct ttagtagtta 1080

ctaaaggttt acgttgagga ataattttat ttattacttc agaagtatta ttttttatat 1140

catttttttg aggatttttt catagatcat tagcaccaac tattgaatta ggaatacttt 1200

gacctcctaa aggaattcaa gcctttaacc cattagaaat ccctttatta aatactttaa 1260

ttcttttaac ttcgggatta actgtaactt gagcccatca tagcctaata gaaaaataat 1320

ttttctcaag gacttcaagg attaattttt acagtaacat taggaattta ttttactatt 1380

ttacaaggat atgaatatat tgaatcacct tttgcaattt ctgattcaat ttatggatct 1440

tcatttttta tagcaacagg ttttcatgga ttacatgtaa ttattggaac aaccttctta 1500

ttaatttgtt taattcgcca ttatttaaat catttttcat cgacacatca ctttggtttt 1560

gaagcagcag cttgatactg acattttgta gatgtagtat gattattctt atatatttca 1620

atttactgat gaggtagatt gagtaaatac gtctaccgtt ctcctttaaa tgacgctatt 1680

tgtgctcctg aaagagagca aaagtgccca tggaatccga aggctgacag atctacctca 1740

attcatacaa cggtcaattg gcaagctcca cgtccaaaaa tactgccaaa tgccttgcac 1800

gcaattggta atactccatt gatcaagctt aacagaatac ctcagcaaga aggtttggaa 1860

tgtgatatat atgtaaaatg tgagttcttt aatcctggtg gatcagtaaa agatcgcatg 1920

gcaaacagaa tactgacaga tgccgagaat gaaggtatct taaaaccagg atgtaccatt 1980

atagagccgt cttcaggaaa tactggcatt ggtttggcta tggcagctgc tattaaagga 2040

tataggtgta taatcgtaat gtcagaaaaa atatccaaag agaaagaata cgtaatgaga 2100

gctttgggag ctgaagttat tagatgtcct gtcacagcta attcgttttc tccatatgga 2160

atgtttggta ctgtccatcg tttatcaaaa gaaattccca acagtattat ttttgatcag 2220

ttctctaatc ccggaaatcc actgactcac tacgatacta cagcagaaga aatttatgat 2280

caatgcgaca aaaaagtaga tatgataata atgggagctg gaacaggtgg taccgttacg 2340

ggtataggaa gaaaatttaa agagatttct cccaatacgg aaatcgtttg tgcagatcca 2400

attggatcat cttttgcttt accagaaatt ataaataaaa ctgacgttac tttctgggag 2460

atagaaggta tgggctacga tttcattccc tcaaccttag accgcaaagt cattgacact 2520

tggattaaag taggtgatga gaatgccctg ccaatggcaa gaaggttgat taaggatgaa 2580

ggccttttga ttggggctag cagtggagct atgatgtggg cggctattca agcagcgaaa 2640

gctaaaaatt atggccctgg taaaagggtt gtagttatgt taccagatag tattaggaac 2700

tacttaacaa agttcgtatg tgaccaatgg atggaagagc gaaatcttca gccttgtgta 2760

aatacaaaca accacccgtg gtggaattta aatgtctccc aattaaatct tcctgtacca 2820

caaactgtac cgataaattc ttccattgaa cagactttga atctaatgaa gaaacttgga 2880

cttaaccaga tacctgcatt ggatgatcaa gggggtgttg ttggagtact ttcaatgcag 2940

ctaattatta acaaacttac atctggtaat gctacactca atgacccaat agcagatgct 3000

atagaccgac tttatcccag agttgagaaa tctgctaata ttggactcgt ctcaagagta 3060

ttggaacgtg agccttattt ggtaattttg gatacacaag gtaaaggacc ttccaagata 3120

aataagcctg caggcgttgt aactccttta gattttctac agtttatcca gaagcagcat 3180

taaatataga ggagactaat atttccacca tttaacaaaa gtaatcacca taaagtgata 3240

aaataaataa tacctaatat aatagaaata ttagaaataa tagaaattat agattataat 3300

aaataaataa gtattataat caaaaaaaaa aaaaaaaggg gcggcgcccc ttttttttt 3360

ttt 3363

<210> 173
<211> 843
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera

<400> 173
ctcataatat tatgccaaaa atttaaaata gtatttcgag gagaaattct ttataaaaaa 60

aattgtatct ttctttatat ttctggtgat atttatgaaa aacacaccag caatatgttt 120

gctatatcga ggagatcaat agctgcttta acacaaatca gatcaaagac agacaaggcc 180

gttttggacg aaattattcg agtagatcat gctggagaat tgggagcaga tcgtatttat 240

gcaggccaga tgttcattct aggcagcact tcaaaagcac ctttgataag acatatgtgg 300

gaacaagaaa aacatcacaa agctacattc gaagatctaa ttagaaaaaa acgtgttaga 360

cctacagtaa tgactcctat ttggaatgtt gcaggcttcg ccttaggagc aggatcagca 420

ttgcttggag acaaagcagc tatggcgtgt actgtggctg tcgaaacagt aattgtagat 480

cattataatg accaactgag aactctgttg gaagatccag agtgtgataa agagcttgta 540

gaaactatta agaagtttag agacgaggaa caagaacatc atgaccatgg cattgatcag 600

ggagcaaagc agactccttt ttatgaagcg tttactaatg tcattaaagc tggatgcaaa 660

gcagctatag caatatcgaa agtagtttaa cttgtgttta tgtacatatt atgtagttga 720

ttgtgaaata tatgttgtta aatttgtaaa gtattgacag tattatatat ttttggatat 780

aaagttagtc ccactatgtg tacagaaaaa tctaataaaa taaaatcaat ttaaatacag 840

att 843

<210> 174

<211> 704

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 174

aaagaccttg aagatcttct accatggcat gagaagcctg tgaagataca ggtcttagtt 60

ctagacatgt agagggacat aatctgtgtt atattttaga tcacaaaaga gtgcaattaa 120

ggctgttgtg tgatgagtac tagacaggaa gaaagagcag actcccagga tatctcgtgg 180

ttgagtctta tgatcaacaa tatacatatt ttgcatcaga atcttgatag atcaggctat 240

cttctaatta ttcttctatt ttttgttttt ttctcgagtt agctcagttt tttcctattt 300

ttttttggt acttttgcta gatatatttt acacatactc atttttatga gtcttaagtg 360

caatacgttg gtaacggaat actggttatt tgtcattcct tccttgtcgt acctaggttg 420

tttctcttta cttcaatagt tacaatgact atttgatttt tgattgtgtc aagctataca 480

agaaataaga gagtaatcag gagagagaaa gagagaaaag attgagtaat ctgtaagaca 540

tcaaaagatg aaaagaccta gaacatcttc tatcatagtt gtaagaggat gatgaaaggc 600

acaggtatta gttcaatcca gataaaaaat gaagtgttaa aagacataga agaaaaactt 660

ttgtgtacag tcgtacagta gacataggaa tacagcgaag atgc 704

REIVINDICACIONES:

1 Un método para controlar infestaciones de invertebrados plaga CARACTERIZADO PORQUE comprende introducir en la dieta de un invertebrado plaga un agente que comprende un ácido nucleico que, al ser ingerido por la plaga, funciona inhibiendo la expresión de una secuencia blanco en dicha plaga, consistiendo dicho ácido ribonucleico en una secuencia de ribonucleótidos que es o es complementaria con dicha secuencia blanco, donde dicha secuencia de ribonucleótidos se transcribe a partir de una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y el complemento de ésta

2 El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicho invertebrado plaga se selecciona del grupo que consiste en una plaga vegetal y una plaga animal, y donde dicha plaga vegetal se selecciona del grupo que consiste en insectos plaga, ácaros plaga y nematodes plaga

3. Un ácido ribonucleico aislado CARACTERIZADO PORQUE, al introducirse en la dieta de un invertebrado plaga, funciona controlando infestaciones de invertebrados plaga, al inhibir la expresión de una secuencia blanco en dicha plaga, donde dicho ácido ribonucleico comprende una secuencia de ribonucleótidos transcripta a partir de una secuencia de ADN que es entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100% idéntica a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y el complemento de ésta

4 Un método para inhibir la expresión de una secuencia de nucleótidos blanco en una plaga vegetal, CARACTERIZADO PORQUE comprende introducir en la dieta de una plaga un agente que, al ser ingerido por dicha plaga, inhibe la expresión de una secuencia de nucleótidos en dicha plaga, donde dicho agente comprende un ácido ribonucleico que se expresa a partir

de una secuencia de ADN que es entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100% idéntica a una secuencia codificante de nucleótidos presente en dicha plaga, donde dicha secuencia codificante de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y el complemento de ésta.

5 Una composición de polinucleótidos para usar en una célula vegetal, CARACTERIZADO PORQUE comprende un cassette de expresión que comprende un promotor funcional en plantas, unido operativamente a un elemento de secuencia de nucleótidos que comprende entre aproximadamente 50 y aproximadamente 5000 nucleótidos contiguos, que presenta entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100% de identidad de secuencia con una secuencia codificante de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y el complemento de ésta, donde la ingestión de dicha composición de polinucleótidos por un invertebrado plaga de plantas inhibe una función biológica esencial en dicha plaga.

6. Una célula vegetal CARACTERIZADA PORQUE comprende la composición de polinucleótidos de la reivindicación 5, una planta regenerada a partir de la célula vegetal, una planta de la progenie producida a partir de la planta regenerada, donde dicha planta de la progenie comprende dicha composición de polinucleótidos, y una semilla producida a partir de la planta de la progenie, donde dicha semilla comprende dicha composición de polinucleótidos

7. Un agente para controlar insectos CARACTERIZADO PORQUE comprende una secuencia de ribonucleótidos producida a partir de la expresión de una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y el complemento de ésta, donde dicha secuencia de ribonucleótidos, al ser ingerida por un invertebrado

plaga, funciona inhibiendo la expresión de una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria con dicha secuencia de ADN

8 Un método para proteger una planta de infestaciones de insectos, CARACTERIZADO PORQUE comprende introducir en la dieta de dicho insecto una o más células de dicha planta que expresan una molécula de ARN a partir de una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y el complemento de ésta, donde la ingestión de dichas una o más células por dicho insecto resulta en la inhibición de una función biológica en dicho insecto

9 El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE dichas células vegetales que expresan dicho ARN comprenden un agente plaguicida seleccionado del grupo que consiste en una patatina, una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*, una proteína insecticida de *Xenorhabdus*, una proteína insecticida de *Photorhabdus*, una proteína insecticida de *Bacillus laterosporous* y una proteína insecticida de *Bacillus sphearicus*

10 El método de la reivindicación 9, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* se selecciona del grupo que consiste en Cry1, Cry3, TIC851, CryET70, Cry22, una proteína insecticida binaria CryET33 y CryET34, una proteína insecticida binaria CryET80 y CryET76, una proteína insecticida binaria TIC100 y TIC101, y una proteína insecticida binaria PS149B1.

11 Un método para inhibir la expresión de un producto de un gen blanco en una o más células de un insecto plaga, CARACTERIZADO PORQUE comprende introducir en dichas una o más células una cantidad capaz de suprimir genes de una molécula de ARN en la dieta de dicho insecto, donde dicha molécula de ARN capaz de suprimir genes se produce a partir de una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y el complemento de ésta, donde

la ingestión de dicho ARN supresor de genes resulta en una disminución en el nivel de dicho producto génico blanco en las células de dicho insecto plaga.

12 El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia de ADN se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 17, SEQ ID Nº 18, SEQ ID Nº 31, SEQ ID Nº 32, SEQ ID Nº 35, SEQ ID Nº 36, SEQ ID Nº 39, SEQ ID Nº 40, SEQ ID Nº 43, SEQ ID Nº 44, SEQ ID Nº 47, SEQ ID Nº 48, SEQ ID Nº 52, SEQ ID Nº 53, SEQ ID Nº 56, SEQ ID Nº 57, SEQ ID Nº 60SEQ ID Nº 60, SEQ ID Nº 61, SEQ ID Nº 64, SEQ ID Nº 65, SEQ ID Nº 68, SEQ ID Nº 69, SEQ ID Nº 72, SEQ ID Nº 73, SEQ ID Nº 76, SEQ ID Nº 77, SEQ ID Nº 80, SEQ ID Nº 81, SEQ ID Nº 84, SEQ ID Nº 85, SEQ ID Nº 88, SEQ ID Nº 89, SEQ ID Nº 92, SEQ ID Nº 93, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174 y el complemento de ésta

13. El método de la reivindicación 12, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia de ADN se selecciona del grupo que consiste en 19-21 nucleótidos contiguos como se indica en SEQ ID Nº 17 y SEQ ID Nº 31

14 Un cassette de expresión CARACTERIZADO PORQUE comprende una secuencia de ADN como se indica en la reivindicación 13.

15 El método de acuerdo con la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE dicho gen blanco codifica una proteína cuya función predicha se selecciona del grupo de funciones que consiste en formación de músculos, formación de hormona juvenil, regulación de hormona juvenil, regulación y transporte de iones, síntesis de enzimas digestivas, mantenimiento del potencial de la membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación de esperma, síntesis de feromonas, percepción de feromonas, formación de las antenas, formación de las alas, formación de las patas, desarrollo y diferenciación, formación de los huevos, maduración de las larvas, formación de enzimas digestivas, síntesis de hemolinfa, mantenimiento

de la hemolinfa, neurotransmisión, división celular, metabolismo energético, respiración, y apoptosis

16 El método de acuerdo con la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE dicho insecto es una *Diabrotica* spp. que se selecciona del grupo que consiste en *Diabrotica virgifera, Diabrotica barberi* y *Diabrotica undecimpunctata*.

17 Un método para controlar infestaciones de invertebrados plaga, CARACTERIZADO PORQUE comprende introducir en la dieta de un invertebrado plaga un agente que comprende una primera secuencia de ribonucleótidos que, al ser ingerida por la plaga, funciona inhibiendo una función biológica en dicha plaga, donde dicha secuencia de ribonucleótidos presenta entre aproximadamente 85 y aproximadamente 100% de identidad de secuencia nucleótidos con una secuencia codificante derivada de dicha plaga, e hibridiza con una segunda secuencia de ribonucleótidos que es complementaria con dicha primera secuencia de ribonucleótidos, y donde dicha secuencia codificante derivada de dicha plaga se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y los complementos de ésta

18 Un método para controlar infestaciones de invertebrados plaga, CARACTERIZADO PORQUE comprende introducir en la dieta de un invertebrado plaga un agente que comprende una primera secuencia de ribonucleótidos que, al ser ingerida por la plaga, funciona inhibiendo una función biológica en dicha plaga, donde dicha secuencia de ribonucleótidos presenta entre aproximadamente 95 y aproximadamente 100% de identidad de secuencia de nucleótidos a lo largo de entre aproximadamente 14 y aproximadamente 25 nucleótidos contiguos con una secuencia codificante derivada de dicha plaga, e hibridiza con una segunda secuencia de ribonucleótidos que es complementaria con dicha primera secuencia de

ribonucleótidos, y dicha secuencia codificante derivada de dicha plaga se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y los complementos de ésta.

19. Una secuencia de nucleótidos CARACTERIZADA PORQUE comprende una molécula de ARN que, al proporcionarse en una cantidad capaz de inhibir una plaga en la dieta de una plaga, inhibe la alimentación de la plaga con la dieta que contiene la molécula de ARN, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y los complementos de ésta.

20. La secuencia de nucleótidos de la reivindicación 19, CARACTERIZADA PORQUE dicha dieta se selecciona del grupo que consiste en una dieta artificial, una célula vegetal, una pluralidad de células vegetales, un tejido vegetal, una raíz de planta, una semilla de una planta y una planta cultivada a partir de una semilla de una planta, donde dicha dieta comprende una cantidad capaz de inhibir una plaga de dicha molécula de ARN

21 La secuencia de nucleótidos de la reivindicación 19, CARACTERIZADA PORQUE dicha secuencia comprende al menos aproximadamente 19 nucleótidos contiguos, como se indica en SEQ ID Nº 97.

22 La secuencia de nucleótidos de la reivindicación 21, CARACTERIZADA PORQUE, además, los aproximadamente 19 nucleótidos contiguos se seleccionan entre el nucleótido en la posición 58 y aproximadamente el nucleótido 1010, como se indica en SEQ ID Nº 97

23 Un método para proteger una planta de las infestaciones de insectos, CARACTERIZADO PORQUE comprende

a) introducir en la dieta del insecto una célula vegetal que expresa un ARN que suprime un gen en el insecto y desempeña una función esencial para la supervivencia del insecto, donde dicha función se selecciona del grupo que consiste la reducción de la alimentación de la

plaga, la reducción de la viabilidad de la plaga, la apoptosis celular en la plaga, la inhibición de la diferenciación y el desarrollo de la plaga o de cualquier célula de la plaga, la ausencia o la reducción de la capacidad o el deseo de reproducción sexual de la plaga, la formación de músculo, la activación muscular, la contracción muscular, la formación de hormona juvenil, la regulación de hormona juvenil, la regulación y el transporte de iones, el mantenimiento del potencial de la membrana celular, la biosíntesis de aminoácidos, la degradación de aminoácidos, la formación de esperma, la síntesis de feromonas, la percepción de feromonas, la formación de las antenas, la formación de las alas, la formación de las patas, la formación de huevos, la maduración de las larvas, la formación de enzimas digestivas, la síntesis de hemolinfa, el mantenimiento de la hemolinfa, la neurotransmisión, la transición del estado larval, la formación de pupas, la emergencia de la forma de pupa, la división celular, el metabolismo energético, la respiración, y cualquier componente de la estructura del citoesqueleto de las células eucariotas, y

b) cultivar una planta que comprende dichas células vegetales

24 Un método para mejorar el rendimiento de un cultivo producido a partir de una planta de cultivo sometido a una infestación de insectos plaga, CARACTERIZADO PORQUE comprende los siguientes pasos

a) cultivar dicha planta de cultivo usando semillas que comprenden una o más moléculas de ARN que suprimen uno o más genes blanco de un insecto plaga que haya ingerido una porción de dicha planta de cultivo en su dieta, donde dichos uno o más genes blanco desempeñan al menos una función esencial en la fisiología y el metabolismo del insecto, donde dicha función esencial se selecciona del grupo que consiste la alimentación de la plaga, la viabilidad de la plaga, la apoptosis celular de

la plaga, la diferenciación y el desarrollo de la plaga o de cualquier célula de la plaga, la reproducción sexual de la plaga, la formación de músculo, la activación muscular, la contracción muscular, la formación y/o la reducción de hormona juvenil, la regulación de hormona juvenil, la regulación y el transporte de iones, el mantenimiento del potencial de la membrana celular, la biosíntesis de aminoácidos, la degradación de aminoácidos, la formación de esperma, la síntesis de feromonas, la percepción de feromonas, la formación de las antenas, la formación de las alas, la formación de las patas, la formación de huevos, la maduración de las larvas, la formación de enzimas digestivas, la síntesis de hemolinfa, el mantenimiento de la hemolinfa, la neurotransmisión, la transición del estado larval, la formación de pupas, la emergencia de la forma de pupa, la división celular, el metabolismo energético, la respiración, y cualquier componente de la estructura del citoesqueleto de las células eucariotas, y

b) observar un mejoramiento en el porcentaje de rendimiento de dicha planta de cultivo.

25. Un producto primario o un producto derivado comercial producido a partir de la semilla obtenida de una planta transgénica, CARACTERIZADO PORQUE dicha planta transgénica expresa un ARN a partir de una o más secuencias de nucleótidos contiguos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y los complementos de éstas, y donde dicha una o más secuencias de nucleótidos pueden detectarse dentro del producto primario o el producto derivado comercial.

26. Una secuencia de nucleótidos contiguos CARACTERIZADA PORQUE tiene al menos aproximadamente 21 nucleótidos de longitud y se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1-143 y 169-174, expresada como una

secuencia de ARN e introducida en la dieta de un insecto plaga, y cuya ingestión en una cantidad capaz de inhibir la plaga de dicho ARN inhibe la alimentación posterior de la plaga con dicha dieta

27. Una célula vegetal transformada CARACTERIZADA PORQUE está transformada con una secuencia de nucleótidos contiguos de al menos aproximadamente 21 nucleótidos de longitud, seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1-143, y 169-174, expresándose dicha secuencia de nucleótidos en la célula vegetal como un segmento de ARN introducido en la dieta de un insecto plaga, donde (a) la ingestión de dicho ARN por el insecto plaga resulta en la supresión de un gen que codifica una proteína expresada a partir de dicho gen, y (b) la ingestión de una cantidad capaz de inhibir el insecto plaga de dicho ARN inhibe la alimentación posterior de la plaga con dicha dieta

28 Un método para seleccionar una secuencia de nucleótidos para expresar un ARN que puede usarse en la inhibición de un gen en las células de un insecto plaga, CARACTERIZADO PORQUE comprende los siguientes pasos

(a) aislar ARNm de un huésped vegetal,

(b) producir un ARN a partir de la totalidad o una parte de una secuencia de ADNc derivada del ARNm,

(c) introducir el ARN en la dieta del insecto plaga,

(d) seleccionar un ARN que inhibe la expresión de dicho gen en dicho insecto plaga; y

(e) seleccionar una secuencia de nucleótidos que hibridiza con dicho ARN del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1-143, 169-174, o el complemento de éste

29. Un método para controlar un insecto plaga, CARACTERIZADO PORQUE comprende introducir en la dieta del insecto plaga dos o más agentes insecticidas tóxicos para la misma especie de insecto, donde un primer agente

insecticida comprende una molécula de ARN expresada a partir de una secuencia de ADN, donde dicha molécula de ARN inhibe una función biológica en dicha plaga cuando es ingerida por la plaga, donde una porción de dicha secuencia de ADN que consiste en al menos aproximadamente 21 nucleótidos contiguos presenta entre aproximadamente 85% y aproximadamente 100% de identidad de secuencia de nucleótidos con una secuencia codificante derivada de dicha plaga, y donde se proporciona un segundo agente insecticida en combinación con el primer agente insecticida en la dieta, donde dicho segundo agente insecticida es diferente del primero

30 El método de la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE dicha plaga es una oruga de la raíz de maíz y dicha secuencia codificante derivada de dicha plaga se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1-143, y 169-174.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE INSECTOS EN PLANTAS

RESUMEN

Control de las infestaciones de plagas mediante la inhibición de una o más funciones biológicas en un invertebrado plaga Se describen métodos y composiciones para usar en el control de infestaciones de plagas, mediante la alimentación de una o más moléculas de ARN de cadena doble recombinantes diferentes a la plaga, con el fin de efectuar una reducción en la infestación de plagas mediante la supresión de la expresión genética La invención también se relaciona con métodos para preparar plantas transgénicas que expresan las moléculas de ARN de cadena doble, y con combinaciones específicas de agentes plaguicidas transgénicos para usar en la protección de las plantas de infestaciones de plagas.

557

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ___ PCT __X__ MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) Nº de solicitud (22) Fecha de solicitud
(51) Clasificacion Internacional

(71)Solicitante(s) **MONSANTO TECHNOLOGY, LLC**

(72) Inventor(es **JAMES A. BAUM, LARRY A. GILBERTSON, DAVID K. KOVALIC, THOMAS J. LAROSA, MAOLONG LU, TICHAFA R I MUNYIKWA, JAMES K. ROBERTS, WEI WU, BEI ZHANG**

(74) Apoderado **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad (31) **No Prioridad** 32) **Fecha** (33) **País**
VER ANEXO # 2

(85) Fecha inicio fase nacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentacion de la solicitud **08/04/2005**
No de solicitud **PCT/US2005/011816**

(87) Publicacion internacional
Fecha **24/11/2005**
No publicacion **WO 2005/110068 A2**

(54) Titulo **COMPOSICIONES Y METODOS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE INSECTOS EN PLANTAS**

560

ANEXO # 2

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
		60/560 842		09/04/2004		US
		60/565.632		27/04/2004		US
		60/579.062		11/06/2004		US
		60/603 421		20/08/2004		US
		60/617.261		11/10/2004		US
		60/669.175		07/04/2005		US

561

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ___ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) N° de solicitud (22) Fecha de solicitud
(51) Clasificacion Internacional

(71)Solicitante(s) **MONSANTO TECHNOLOGY, LLC**

(72) Inventor(es) **JAMES A BAUM, LARRY A GILBERTSON, DAVID K. KOVALIC, THOMAS J. LAROSA, MAOLONG LU, TICHAFA R.I. MUNYIKWA, JAMES K ROBERTS, WEI WU, BEI ZHANG**

(74) Apoderado **DRA MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad (31) **No Prioridad** 32) **Fecha** (33) **Pais**
VER ANEXO # 2

(85) Fecha limite inicio fase nacional
(86) Datos relativos a la presentacion de la solic PCT
Fecha de presentacion de la solicitud **08/04/2005**
No de solicitud **PCT/US2005/011816**

(87) Publicación internacional
Fecha **24/11/2005**
No Publicacion **WO2005/110068 A2**

(54) Titulo **COMPOSICIONES Y METODOS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE INSECTOS EN PLANTAS**

(57) Resumen

Un metodo para controlar infestaciones de invertebrados plaga CARACTERIZADO PORQUE comprende introducir en la dieta de un invertebrado plaga un agente que comprende un acido nucleico que, al ser ingerido por la plaga, funciona inhibiendo la expresión de una secuencia blanco en dicha plaga, consistiendo dicho ácido ribonucleico en una secuencia de ribonucleótidos que es o es complementaria con dicha secuencia blanco, donde dicha secuencia de ribonucleótidos se transcribe a partir de una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 143, SEQ ID N° 169 a SEQ ID N° 174, y el complemento de esta

CONTINUA AL RESPALDO

Una composición de polinucleótidos para usar en una célula vegetal, CARACTERIZADO PORQUE comprende un cassette de expresión que comprende un promotor funcional en plantas, unido operativamente a un elemento de secuencia de nucleotidos que comprende entre aproximadamente 50 y aproximadamente 5000 nucleótidos contiguos, que presenta entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100% de identidad de secuencia con una secuencia codificante de nucleotidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143, SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y el complemento de ésta, donde la ingestion de dicha composición de polinucleotidos por un invertebrado plaga de plantas inhibe una función biológica esencial en dicha plaga

Una secuencia de nucleótidos CARACTERIZADA PORQUE comprende una molecula de ARN que, al proporcionarse en una cantidad capaz de inhibir una plaga en la dieta de una plaga, inhibe la alimentación de la plaga con la dieta que contiene la molécula de ARN, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 143 y SEQ ID Nº 169 a SEQ ID Nº 174, y los complementos de ésta

ANEXO # 2

(30) Prioridad	(31)	No Prioridad	(32)	Fecha	(33)	Pais
		60/560 842		09/04/2004		US
		60/565 632		27/04/2004		US
		60/579 062		11/06/2004		US
		60/603 421		20/08/2004		US
		60/617.261		11/10/2004		US
		60/669.175		07/04/2005		US

563

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud

22) Fecha de solicitud

(51) Int Cl

(71)Solicitante(s) **MONSANTO TECHNOLOGY, LLC**

(30) Prioridad

(31) No Prioridad	32) Fecha	(33) País
60/560 842	09/04/2004	US
60/565 632	27/04/2004	US
60/579.062	11/06/2004	US
60/603.421	20/08/2004	US
60/617.261	11/10/2004	US
60/669.175	07/04/2005	US

(72) Inventor(es) **JAMES A. BAUM, LARRY A. GILBERTSON, DAVID K KOVALIC, THOMAS J LAROSA, MAOLONG LU, TICHAFA R.I. MUNYIKWA, JAMES K. ROBERTS, WEI WU, BEI ZHANG**

(74) Apoderado **DRA MARGARITA CASTELLANOS A**

(85) Fecha límite inicio fase nacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud **08/04/2005**
No de solicitud **PCT/US2005/011816**

(87) Publicación internacional
Fecha **24/11/2005**
N° publicación **WO 2005/110068 A2**

(54) Título **COMPOSICIONES Y METODOS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE INSECTOS EN PLANTAS**

Reivindicación(es)

Un método para controlar infestaciones de invertebrados plaga CARACTERIZADO PORQUE comprende introducir en la dieta de un invertebrado plaga un agente que comprende un ácido nucleico que, al ser ingerido por la plaga, funciona inhibiendo la expresión de una secuencia blanco en dicha plaga, consistiendo dicho ácido ribonucleico en una secuencia de ribonucleótidos que es o es complementaria con dicha secuencia blanco, donde dicha secuencia de ribonucleotidos se transcribe a partir de una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 143, SEQ ID N° 169 a SEQ ID N° 174, y el complemento de esta

Una composicion de polinucleótidos para usar en una célula vegetal, CARACTERIZADO PORQUE comprende un cassette de expresión que comprende un promotor funcional en plantas, unido operativamente a un elemento de secuencia de nucleotidos que comprende entre aproximadamente 50 y aproximadamente 5000 nucleótidos contiguos, que presenta entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100% de identidad de secuencia con una secuencia codificante de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 143, SEQ ID N° 169 a SEQ ID N° 174, y el complemento de ésta, donde la ingestion de dicha composición de polinucleótidos por un invertebrado plaga de plantas inhibe una función biológica esencial en dicha plaga

Una secuencia de nucleotidos CARACTERIZADA PORQUE comprende una molecula de ARN que, al proporcionarse en una cantidad capaz de inhibir una plaga en la dieta de una plaga, inhibe la alimentación de la plaga con la dieta que contiene la molécula de ARN, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 143 y SEQ ID N° 169 a SEQ ID N° 174, y los complementos de esta

564

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-101066- -00000-0000
Fec. 2006-10-06 14:38:51 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII
Eva: 379 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios: 563

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRÁMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (X) MODELO DE UTILIDAD ( )	(X)	( )
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	(X)	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	(X)	( )
- Descripción de la invención	(X)	( )
- Dibujos de ser estos pertinentes	( )	( )
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	(X)	( )

COMPLETA ( ) INCOMPLETA (X)

DISEÑO INDUSTRIAL ( )

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	( )	( )
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño	( )	( )
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	( )	( )

COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )

EZQUEMA DE TRAZADO ( )

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	( )	( )
- Representación gráfica del Esquema de Trazado	( )	( )
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	( )	( )

COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )

Firma responsable: _____

Fecha _____

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

365

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CASTELLANOS ABONDANO MARGARITA
Apoderado(a) y/o Representante de
MONSANTO TECHNOLOGY LLC.

REFERENCIA	Radicación No.	6 101066
	Solicitud internacional	PCT/US2005/011816
	Fecha inicio fase nacional	09/11/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	13898

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

3. Debe aclarar el número de la prioridad de fecha 07/04/2005 y número 60/669,175; por cuanto difiere de la citada en la publicación internacional

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 01 DIC. 2006
adpa11