17	ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción N° de folios: 224
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 29
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 1
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☒ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poder de DOW AGROSCIENCES LLC.
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medianas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $80.000.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	NUMERO DE RADICACIÓN
☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad		FECHA DE PRESENTACIÓN

4	(71) SOLICITANTE (S)			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2. FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E. V.			

5	DATOS DEL SOLICITANTE		
PAÍS DE RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Alemania		München	Hansastraße 27c 80686 München, Alemania
TELÉFONO	FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD

6	(72) INVENTOR (ES)		
APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD
6. GANDRA	Premchand	Estadounidense
7. WORDEN	Sarah E.	Estadounidense
8. VILCINSKAS	Andreas	Alemán
9. KNORR	Eileen	Alemán
10. FISHILEVICH	Elane	Estadounidense
11. RANGASAMY	Murugesan	Estadounidense
12. FREY	Meghan L.F.	Estadounidense

7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN	CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
6. 9330 Zionsville Rd. Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América	Indianápolis	Indiana	Estados Unidos de América
7. 9330 Zionsville Rd. Indianapolis, Indiana 46268 Estados Unidos de América.	Indianápolis	Indiana	Estados Unidos de América
8. Winchesterstr. 2 35394 Giessen, Alemania	Giessen		Alemania
9. Winchesterstr. 2 35394 Giessen, Alemania	Giessen		Alemania
10. 9330 Zionsville Rd. Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América.	Indianápolis	Indiana	Estados Unidos de América
11. 9330 Zionsville Rd. Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América.	Indianápolis	Indiana	Estados Unidos de América
12. 9330 Zionsville Rd. Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América	Indianápolis	Indiana	Estados Unidos de América

9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD		
PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)

TÍTULO DE LA INVENCIÓN

RAS OPUESTO (ROP) Y MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO RELACIONADAS QUE CONFIEREN RESISTENCIA A PLAGAS DE COLEÓPTEROS Y HEMÍPTEROS

REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud de patente de los Estados Unidos número 61/919,322, presentada el 20 de diciembre de 2013, para "RAS OPUESTO (ROP) Y MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO RELACIONADAS QUE CONFIEREN RESISTENCIA A PLAGAS DE COLEÓPTEROS Y HEMÍPTEROS"

CAMPO TÉCNICO

Campo de la Invención: La presente invención se refiere generalmente a control de daños a plantas causados por plagas de coleópteros y hemípteros. En modalidades particulares, la presente invención se refiere a la identificación de secuencias diana codificantes y no codificantes, y su uso para reprimir o inhibir después de la transcripción la expresión de las secuencias diana codificantes y no codificantes en las células de una plaga de coleópteros y/o hemípteros para proporcionar un efecto protector a la planta.

ANTECEDENTES

La crisomela del maíz del oeste (WCR por sus siglas en inglés), *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, es una de las especies de gusanos de raíz del maíz más devastadoras en América del Norte y es una preocupación particular en zonas de cultivo de maíz del medio oeste de Estados Unidos. La crisomela del maíz del norte (NCR, por sus siglas en inglés), *Diabrotica barberi* Smith y Lawrence, es una especie estrechamente relacionada que co-habita en gran parte del mismo rango que la WCR. Hay otras varias subespecies de *Diabrotica* que son plagas importantes en América del Norte: la crisomela del maíz mexicana (MCR por sus siglas en inglés), *D. virgifera zeae* Krysan y Smith; la crisomela del maíz del sur (SCR), *D. undecimpunctata howardi* Barber; *D. balteata* LeConte; *D. undecimpunctata tenella*; y *D. u. undecimpunctata* Mannerheim. Actualmente, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos calcula que las crisomelas del maíz causan $ 1000 millones en pérdidas de ingresos cada año, incluyendo $ 800 millones en pérdidas de rendimiento y $ 200 millones en costos de tratamiento.

Los huevos de WCR y NCR son depositados en la tierra durante el verano. Los insectos permanecen en la fase de huevo durante el invierno. Los huevos son oblongos, blancos y menores a 0,010 cm de longitud. La eclosión de las larvas a finales de mayo o principios de junio, en donde el momento exacto de la eclosión del huevo varía de año en año

debido a la ubicación y las diferencias de temperatura. Las larvas recién nacidas son gusanos blancos de menos de 0,3175 cm de longitud. Una vez eclosionadas, las larvas comienzan a alimentarse de las raíces del maíz. Las crisomelas del maíz pasan por tres instares larvales. Después de alimentarse durante varias semanas, la larva muda a la etapa pupal. Forman pupas en la tierra, y luego emergen de la tierra como adultos en julio y agosto. Las crisomelas adultas son de aproximadamente 0,635 cm de longitud.

Las larvas de crisomela del maíz completan su desarrollo en el maíz y varias otras especies de gramíneas. Las larvas criadas en césped amarillo emergen más tarde y tienen un tamaño de cápsula de cabeza más pequeño como adultos que las larvas cultivadas en el maíz. Ellsbury et al. (2005) Environ. *Entomol.* 34:627-634. Las WCR adultas se alimentan de seda de maíz, polen y granos en puntas expuestas. Si las WCR adultas surgen antes de que los tejidos reproductivos del maíz estén presentes, se pueden alimentar de tejido foliar, retardando de esta manera el crecimiento vegetal y en ocasiones matando a la planta anfitriona. Sin embargo, los adultos se desplazarán rápidamente al polen y sedas preferidas cuando estén disponibles. Las NCR adultas también se alimentan de los tejidos reproductivos de la planta de maíz, pero en cambio rara vez se alimentan de hojas de maíz.

La mayoría de los daños de la crisomela del maíz son causados por la alimentación larval. Las crisomelas

recién eclosionadas inicialmente se alimentan de pelos de raíz de maíz finos y hurgan en las puntas de las raíces. A medida que las larvas crecen, se alimentan de y hurgan en las raíces primarias. Cuando las crisomelas del maíz son abundantes, la alimentación larval a menudo resulta en la poda de raíces hasta la base del tallo del maíz. Las lesiones severas de la raíz interfieren con la habilidad de las raíces para transportar agua y nutrientes a la planta, reduce el crecimiento de las plantas y resulta en la producción reducida de granos, a menudo reduciendo drásticamente el rendimiento general de esta forma. Las lesiones severas de la raíz también resultan a menudo en el alojamiento de plantas de maíz, lo que hace más difícil la cosecha y disminuye aún más el rendimiento. Además, la alimentación de los adultos sobre los tejidos reproductivos del maíz puede resultar en la poda de las sedas en la punta. Si este "recorte de seda" es lo suficientemente severo durante el cobertizo de polen, la polinización puede interrumpirse.

Es posible tratar de controlar las crisomelas del maíz mediante la rotación de cultivos, los insecticidas químicos, biopesticidas (por ejemplo, bacteria Gram-positiva esporulante, *Bacillus thuringiensis*) o una combinación de estos. La rotación de cultivos sufre la desventaja significativa de colocar restricciones no deseadas sobre el uso de las tierras de labrantío. Por otra parte, la oviposición de algunas especies de crisomelas puede darse en cultivos de soya, mitigando así la efectividad de la rotación

de cultivos practicada con el maíz y la soya.

Los insecticidas químicos son la estrategia más confiada para lograr el control de las crisomelas del maíz. El uso de insecticidas químicos, sin embargo, es una estrategia de control imperfecta de la crisomela del maíz; aproximadamente $ 1000 millones se pueden perder en Estados Unidos cada año debido a las crisomelas del maíz cuando los costos de los insecticidas químicos se agregan a los costos del daño por las crisomelas del maíz que pueden ocurrir a pesar del uso de los insecticidas. Las altas poblaciones de larvas, las fuertes lluvias y un uso incorrecto del (los) insecticida(s) pueden resultar en un control inadecuado de las crisomelas del maíz. Además, el uso continuo de insecticidas puede seleccionarse para cepas de crisomelas del maíz resistentes al insecticida, así como plantear preocupaciones ambientales significativas debido a la toxicidad de muchos de ellos para especies no objetivo.

Los chinches (Hemiptera; Pentatomidae) constituyen otro complejo de plaga agrícola importante. En todo el mundo más de 50 especies íntimamente relacionadas de chinches son conocidas por causar daños a los cultivos. McPherson & McPherson, R.M. (2000) *Stink bugs of economic importance in America north of Mexico* CRC Press. Estos insectos están presentes en un gran número de cultivos importantes como maíz, soya, frutas, verduras y cereales. El chinche marrón Neotropical, *Euchistus heros*, el chinche con banda roja, *Piezodorus guildinii*, el chinche marmorata marrón,

Halyomorpha halys y el chinche verde del sur, *Nezara viridula*, son de especial preocupación.

Los chinches pasan por varias etapas de ninfa antes de llegar a la etapa adulta. El periodo de desarrollo de huevos a adultos es de unos 30-40 días. Varias generaciones se producen en climas cálidos, dando lugar a una importante presión de los insectos.

Tanto las ninfas como los adultos se alimentan de la savia de tejidos blandos en los cuales también inyectan enzimas digestivas causando necrosis y digestión de tejido extra oral. Luego se ingieren el material vegetal digerido y los nutrientes. El agotamiento del agua y los nutrientes del sistema vascular de la planta resulta en daño a los tejidos vegetales. El daño a los granos y semillas en desarrollo es el más importante ya que la producción y germinación se reducen significativamente.

El manejo actual de los chinches se basa en el tratamiento con insecticida sobre una base de campo individual. Por lo tanto, se necesitan urgentemente estrategias de manejo alternativas para minimizar las pérdidas de cultivos en curso.

Los escarabajos europeos del polen (EPB) son plagas graves en la colza oleaginosa, tanto las larvas como los adultos se alimentan de las flores y el polen. El daño del escarabajo del polen al cultivo puede causar pérdida de rendimiento de 20-40%. La especie de plaga primaria es *Meligethes aeneus*. En la actualidad, el control del

escarabajo del polen en la colza oleaginosa se basa principalmente en los piretroides que se espera sean eliminados pronto debido a su perfil ambiental y regulatorio. Por otra parte, se ha reportado la resistencia del escarabajo de polen a los insecticidas químicos existentes. Por lo tanto, se necesitan con urgencia soluciones ecológicas de control del escarabajo del polen con nuevos modos de acción.

En la naturaleza, los escarabajos del polen hibernan como los adultos en la tierra o debajo de la hojarasca. En primavera los adultos emergen de la hibernación y comienzan a alimentarse de las flores de las malezas y migran hacia plantas de colza oleaginosa. Los huevos son depositados en la colza oleaginosa. Las larvas se alimentan y desarrollan en los brotes y las flores. La etapa de larvas tardía encuentra un sitio de pupas en la tierra. La segunda generación de adultos emerge en julio y agosto y se alimenta de diversas plantas de floración antes de encontrar los sitios de invernada.

El ARN de interferencia (RNAi) es un proceso que utiliza las vías celulares endógenas, en donde una molécula de ARN de interferencia (ARNi) (por ejemplo, una molécula de ARN de doble cadena (ARNds)) que es específica para todos, o cualquier porción del tamaño adecuado, de una secuencia del gen objetivo resulta en la degradación del ARNm codificado de este modo. En los últimos años se ha utilizado ARNi para realizar "noqueo" genético en un número de especies y sistemas experimentales; por ejemplo, Caenorhabitis elegans,

plantas, embriones de insectos y células en cultivo de tejidos. Véase, por ejemplo, Fire et al. (1998) *Nature* 391:806 811; Martinez et al. (2002) *Cell* 110:563 574; McManus y Sharp (2002) *Nature Rev. Genetics* 3:737 747.

El ARNi logra la degradación del ARNm a través de una vía endógena, incluyendo el complejo de la proteína DICER. DICER escinde largas moléculas de ARNds en fragmentos cortos de aproximadamente 20 nucleótidos, denominados ARN interferente pequeño (ARNsi). Los ARNsi se desenrollan en dos ARNs de una sola hebra: la hebra pasajera y la hebra guía. La hebra pasajera se degrada y la hebra guía se incorpora en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC). Las micro moléculas de ácido ribonucleico (ARNmi) pueden ser igualmente incorporadas en RISC. El silenciamiento post transcripcional se produce cuandola hebra guía se une específicamente a una secuencia complementaria de una molécula de ARNm e induce escisión por Argonaute, el componente catalítico de los complejos de RISC. Este proceso se conoce por difundirse sistemáticamente en todo el organismo a pesar de las concentraciones inicialmente limitadas de ARNsi y/o ARNmi en algunos eucariotas tales como plantas, nematodos y algunos insectos.

Solo las transcripciones complementarias a los ARNsi o ARNmi son escindidas y degradadas, y por lo tanto el noqueo de la expresión de ARNm es específico a la secuencia. En las plantas, existen varios grupos funcionales de genes DICER. El efecto de gen silenciador del ARNi persiste por

días y, en condiciones experimentales, puede conducir a una disminución de la abundancia de la transcripción objetivo de 90% o más, con la consiguiente reducción de los niveles de la proteína correspondiente.

La patente estadounidense No. 7,612,194 y las publicaciones de patente estadounidenses Nos. 2007/0050860, 2010/0192265, y 2011/0154545 divulgan una biblioteca de 9112 marcas de secuencia expresadas (EST) de secuencias aisladas de *D. v. virgifera* LeConte pupae. Se sugiere en la patente estadounidense No. 7,612,194 y la publicación de patente estadounidense No. 2007/0050860 vincular operativamente a un promotor una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una de varias secuencias parciales particulares de *D. v. virgifera* vacuolar tipo H^+ ATPasa (V-ATpasa) divulgada en esos documentos para la expresión de ARN antisentido en las células vegetales. La publicación de patente estadounidense No. 2010/0192265 sugiere vincular operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia parcial de un gen de *D. v. virgifera* de función desconocida y no divulgada (la secuencia parcial se indica que es 58% idéntica al producto del gen C56C10.3 en *C. elegans*) para la expresión de ARN anti sentido en las células vegetales. La publicación de patente estadounidense No. 2011/0154545 sugiere vincular operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a dos secuencias parciales particulares de genes de la subunidad beta de coatómero de *D. v. virgifera* para la expresión de ARN

anti sentido en las células vegetales. Además, la patente estadounidense No. 7,943,819 divulga una biblioteca de 906 marcas de secuencia expresada (EST) de secuencias aisladas de larvas, pupas e intestinos medios disecados de *D. v. virgifera* LeConte y sugiere vincular operativamente un promotor a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia parcial de un gen 4b de proteína de cuerpo multivesicular cargado con *D. v. virgifera* para la expresión de ARN de doble hebra en las células vegetales.

Ninguna otra sugerencia es proporcionada en la patente estadounidense No. 7,612,194 y las publicaciones de patente estadounidenses Nos. 2007/0050860, 2010/0192265 y 2011/0154545 sobre el uso de cualquier secuencia particular de las más de nueve mil secuencias listadas en los mismos para la interferencia del ARN, aparte de las varias secuencias parciales particulares de V-ATpasa y las secuencias parciales particulares de genes de función desconocida. Además, ninguna de las patentes estadounidenses Nos. 7,612,194 y las publicaciones de patentes estadounidenses Nos. 2007/0050860 y 2010/0192265 y 2011/0154545 proporcionan orientación alguna en cuanto a que otras de las más de nueve mil secuencias proporcionadas sería letal, o incluso de otra manera útil, en especies de crisomelas del maíz cuando se utiliza como ARNds o ARNsi. La patente estadounidense No. 7,943,819 no proporciona ninguna sugerencia para utilizar cualquier secuencia particular de

las más de novecientas secuencias listadas en la misma para la interferncia del ARN, además de la secuencia parcial particular de un gen 4b de proteína de cuerpo corporal cargado. Además, la patente estadounidense No. 7,943,819 no proporciona orientación alguna en cuanto a cuáles otras de las más de nueve mil secuencias proporcionadas sería letal, o incluso de otra manera útil, en especies de crisomelas del maíz cuando se utiliza como ARNds o ARNsi. La publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2013/040173 y la publicación de solicitud PCT No. WO 2013/169923 describen el uso de una secuencia derivada de un gen Snf7 de *Diabrotica virgifera* para la interferencia del ARN en el maíz. (También divulgado en Bolognesi et al. (2012) PLos ONE 7(10): e47534. doi:10.1371/journal.pone.0047534).

La inmensa mayoría de las secuencias complementarias al ADN de las crisomelas del maíz (tal como las anteriores) no es letal en especies de crisomelas del maíz cuando se utilizan como ARNds o ARNsi. Por ejemplo, Baum et al. (2007, *Nature Biotechnology* 25:1322 1326), describe los efectos de la inhibición de diversos objetivos genéticos de WCR por el ARNi. Estos autores reportaron que 8 de 26 genes objetivo que probaron no fueron capaces de proporcionar experimentalmente significativa mortalidad de plagas de coleópteros en una concentración muy alta de ARNi (por ejemplo, ARNds) de más de 520 ng/cm^2.

DESCRIPCIÓN

En este documento se divulgan moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, genes objetivo, ADNs, ARNds, ARNsi, ARNmi, ARNsh y ARNhp) y métodos de uso de las mismas, para el control de plagas de coleópteros, incluyendo, por ejemplo *D. v. virgifera* LeConte (crisomela del maíz del oeste, "WCR"); *D. barberi* Smith y Lawrence (crisomela del maíz del norte, "NCR"); *D. u. howardi* Barber (crisomela del maíz del sur, "SCR"); *D. v. zeae* Krysan y Smith (crisomela del maíz mexicana, "MCR"); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; *Meligethes aeneus* Fabricius (escarabajo del polen, "PB"); y plagas de hemípteros incluyendo, por ejemplo *Euschistus heros* (Fabr.) (chinche marrón neotropical), *Nezara viridula* (L.) (chinche verde del sur), *Piezodorus guildinii* (Westwood) (chinche de banda roja) *Halyomorpha halys* (chinche marrón marmorata), *Acrosternum hilare* (chinche verde) y *Euschistus servus* (chinche marrón). En ejemplos particulares, se divulgan moléculas ejemplares de ácido nucleico que pueden ser homólogas a por lo menos una parte de una o más secuencias nativas de ácidos nucleicos en una plaga de coleópteros y/o hemípteros.

En estos y otros ejemplos, la secuencia de ácido nucleico nativa puede ser un gen objetivo, cuyos productos pueden ser, por ejemplo y sin limitación: implicados en un proceso metabólico; implicados en un proceso reproductivo; o implicados en el desarrollo larval. En algunos ejemplos, la inhibición post traslacional de la expresión de un gen

objetivo por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia homóloga correspondiente puede ser letal en plagas de coleópteros y hemípteros o resultar en la reducción del crecimiento o reproducción. En ejemplos específicos, se puede seleccionar un gen que codifica Ras opuesta (la proteína codificada contemplada en el presente documento como "ROP"; y un ácido nucleico que codifica ROP contemplado en el presente documento como "rop") como un gen objetivo para el silenciamiento post transcripcional. En ejemplos particulares, un gen objetivo útil para la inhibición post transcripcional es el nuevo gen rop. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende rop; el complemento de la secuencia de nucleótido que codifica rop; y fragmentos de cualquiera de los anteriores, por lo tanto, se divulgan en el presente documento. Ejemplos de rop incluyen, pero no se limitan a SEQ ID NOs: 1, 115, 120, 122, 124, 126, 131 y 133.

También se divulgan moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es al menos 85% idéntico a una secuencia del aminoácido dentro de un producto génico objetivo (por ejemplo, ROP). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede componerse de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es al menos 85% idéntica a una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 2, 116, 121, 123, 125, 127, 132, ó 134 (un ROP). En ejemplos particulares, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es al menos 85% idéntica a una

secuencia de aminoácidos dentro de ROP. También se divulgan moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que es el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es al menos 85% idéntico a una secuencia del aminoácido dentro de un producto génico objetivo.

También se divulgan secuencias de ADNc que pueden utilizarse para la producción de moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi y ARNhp) que son complementarias a la totalidad o parte de un gen objetivo de plaga de coleópteros y/o hemípteros, por ejemplo: rop. En modalidades particulares, los ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi y/o ARNhp se pueden producir *in vitro* o *in vivo* por un organismo modificado genéticamente, como una planta o una bacteria. En ejemplos particulares, se divulgan moléculas de ADNc que pueden utilizarse para producir moléculas de ARNi que son complementarias a la totalidad o parte de rop (p. Ej. SEQ ID NOs: 1, 115, 120, 122, 124, 126, 131 y 133).

Además se divulgan medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleóptero y/o hemípteros, y los medios para proporcionar resistencia a las plagas de coleópteros y/o hemípteros a una planta. Ejemplos de un medio para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros y/o hemípteros incluye una molécula de ARN de hebra sencilla o de doble hebra que consta de al menos una entre SEQ ID NO: 3 (región de rop *Diabrotica* 1 o reg1 de rop), SEQ ID NO: 4 (región de rop de *Diabrotica 2* o reg2 de

rop), SEQ ID NO: 114 (región de rop de *Diabrotica* v3 o rop v3), SEQ ID NO: 119 (región de rop de *Euschistus* 1 o reg1 de BSB rop), SEQ ID NO: 128 (región rop de *Meligethes* 1 o reg1 de rop EPB) o el complemento de los mismos. Los equivalentes funcionales de medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros y/o hemípteros incluyen moléculas de ARN de una sola o de doble hebra que son sustancialmente homólogas a la totalidad o parte de rop (por ejemplo, un gen de WCR que comprende las SEQ ID NOs: 1 o 115). Los equivalentes funcionales de medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros y/o hemípteros incluyen moléculas de ARN de una sola o de doble hebra que son sustancialmente homólogas a la totalidad o parte de rop (por ejemplo, un gen de PB que comprende SEQ ID NOs: 120, 122, 124, 126, 131 o 133).Otro ejemplo de los medios para proporcionar resistencia a las plagas de coleópteros y/o hemípteros a una planta es una molécula de ADN que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un medio para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de coleópteros y/o hemípteros ligada operablemente a un promotor, en donde la molécula de ADN es capaz de integrarse en el genoma de una planta de maíz o soya.

Se divulgan métodos para el control de una población de una plaga de coleópteros y/o hemípteros, que comprende proporcionar a una plaga de coleópteros y/o hemípteros en una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds,

ARNsi, ARNsh, ARNmi y ARNhp) que funciona al ser tomada por la plaga de coleópteros y/o de hemípteros para inhibir una función biológica dentro de la plaga de coleópteros y/o hemípteros. Por ejemplo, una molécula de iRNA que comprende todo o parte de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo formado por: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 131 y SEQ ID NO: 133; el complemento de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 131 y SEQ ID NO: 133; una secuencia codificante nativa de organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) u organismo de hemípteros (por ejemplo BSB) u organismo de *Meligethes* (por ejemplo, EPB) que comprende todo o parte de alguna de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 131 y SEQ ID NO: 133; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de Diabrotica u organismo de hemíptero u organismo de *Meligethes* que comprende todo o parte de cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 131 y SEQ ID NO: 133; una secuencia no codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* u organismo

de hemípteros u organismo de *Meligethes* que se transcribe en una molécula de ARN nativo que comprende todo o parte de cualquiera entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 131 y SEQ ID NO: 133; y el complemento de una secuencia no codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* u organismo de hemíptero u organismo de *Meligethes* que se transcribe en una molécula de ARN nativo que comprende todo o parte de cualquiera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:115, y SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:131, y SEQ ID NO:133.

También se divulgan en este documento métodos en donde los ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi, y/o ARNhp se pueden proporcionar a una plaga de coleópteros y/o hemípteros en un, o en las células vegetales genéticamente modificadas que expresan los, ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi, y/o ARNhp. En estos y otros ejemplos, los ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi, y/o ARNhp pueden ser ingeridos por las larvas de la plaga de coleópteros y/o hemípteros. La ingestión de los ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi, y/o ARNhp de la invención podría resultar entonces en ARNi en las larvas, que a su vez pueden resultar en el silenciamiento de un gen esencial para la viabilidad de la plaga de coleópteros y/o hemípteros y conduciendo finalmente a la mortalidad de las larvas. Por lo tanto, se describen métodos en los que las moléculas de ácido nucleico

que comprenden secuencia(s) de ácido nucleico ejemplares útiles para el control de plagas de coleópteros y/o de hemípteros se proporcionan a una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En ejemplos particulares, la plaga de coleópteros y/o hemípteros controlada por el uso de moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser WCR, NCR, *Meligethes aeneus*, *Euchistus heros*, *Piezodorus guildinii*, *Halyomorpha halys*, *Nezara viridula* *Acrosternum hilare* y *Euschistus servus*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una representación pictórica de una estrategia para la generación de ARNds desde una única plantilla de transcripción.

La figura 2 es una representación pictórica de una estrategia para la generación de ARNds desde dos plantillas de transcripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS EN EL LISTADO

Las secuencias de ácido nucleico listadas en el listado de secuencias adjunto se muestran utilizando abreviaturas de letra estándar para bases de nucleótidos y aminoácidos, tal como se define en 37 C.F.R. § 1.822. Solo una hebra de cada secuencia de ácido nucleico se muestra, pero la hebra complementaria y la hebra complementaria

inversa se entienden como si estuvieran incluidas por cualquier referencia a la hebra mostrada. En el listado de secuencias adjunto:

La SEQ ID NO: 1 muestra una secuencia de ADN de rop de *Diabrotica virgifera*.

La SEQ ID NO: 2 muestra una secuencia de aminoácidos de rop de *Diabrotica virgifera*.

La SEQ ID NO: 3 muestra una secuencia de ADN de rop de reg1 (región 1) de *Diabrotica virgifera* que fue utilizada para la síntesis *in vitro* de ARNds (las secuencias de promotor de T7 en extremos 5' y 3' no se muestran).

La SEQ ID NO: 4 muestra una secuencia de ADN de rop de reg2 (región 2) de *Diabrotica virgifera* que fue utilizada para la síntesis *in vitro* de ARNds (las secuencias de promotor de T7 en extremos 5' y 3' no se muestran).

La SEQ ID NO: 5 muestra una secuencia de ADN de un promotor de fago de T7.

La SEQ ID NO: 6 muestra una secuencia de ADN de un segmento de región codificadora de YFP que se utilizó para la síntesis *in vitro* de ARNds (las secuencias de promotor de T7 en extremos 5' y 3' no se muestran).

La SEQ ID NOs: 7-12 muestran cebadores usados para amplificar las porciones de una secuencia de *Diabrotica virgifera* que comprende rop de reg1, rop de reg2 y cebadores utilizados para amplificar un segmento de región codificadora de YFP.

La SEQ ID NO: 13 presenta un rop v1 de secuencia

formadora de ARN de horquilla de *Diabrotica virgifera* como se encuentra en pDAB114515. Las mayúsculas son la hebra de sentido rop, las minúsculas subrayadas comprenden intrón de ST-LS1, las minúsculas no subrayadas son hebras antisentido de rop.

TCAGCATGCTGTAAAATGCATGATATATCAGCAGAAGGCATTACATTGGTT
GAAGATATTATGAAGAAAAGGGAACCGCTTGGTACCATGGAAGCTGTGTACTTGATAACAC
CTTCAGAAAAGTCAGTTCATGCTCTTATGAATGACTTTGAACCACCAAGACAGATGTACAG
AGGGGCACACGTGTTTTTTACAGAAGCGTGTCCAGACgactagtaccggttgggaaaggta
tgtttctgcttctacctttgatatatatataataattatcactaattagtagtaatatagt
atttcaagtatttttttcaaaataaaagaatgtagtatatagctattgcttttctgtagtt
tataagtgtgtatattttaatttataacttttctaatatatgaccaaaacatggtgatgtg
caggttgatccgcggttagtctggacacgcttctgtaaaaaacacgtgtgcccctctgtac
atctgtcttggtggttcaaagtcattcataagagcatgaactgacttttctgaaggtgtta
tcaagtacacagcttccatggtaccaagcggttccctttttcttcataatatcttcaaccaa
tgtaatgccttctgctgatatatcatgcattttacagcatgctga

La SEQ ID NO: 14 presenta un rop v3 de secuencia formadora de ARN de horquilla de *Diabrotica virgifera* como se encuentra en pDAB115770. Las mayúsculas son la hebra de sentido rop, las minúsculas subrayadas comprenden intrón de ST-LS1, las minúsculas no subrayadas son hebras antisentido de rop.

CAAGTATGCTACGCATCTTCATCTCGCTGAAGACTGCATGAAGGCCTATCA
GGGGTATATAGACAAGTTGTGTAAAGTTGAGCAGGATTTGGCAATGGGAACTGATGCCGAA
GGCGAGAAAATCAAGGATCACATGCGCAACATCGTCCCCATCTTGCTAGATCCCAAAATCA
CCAATGAATACGATAAGAgactagtaccggttgggaaaggtatgtttctgcttctacctttt
gatatatatataataattatcactaattagtagtaatatagtatttcaagtatttttttca

aaataaaagaatgtagtatatagctattgcttttctgtagtttataagtgtgtatatttta
atttataacttttctaatatatgaccaaaacatggtgatgtgcaggttgatccgcggttat
cttatcgtattcattggtgattttgggatctagcaagatggggacgatgttgcgcatgtga
tccttgattttctcgccttcggcatcagttcccattgccaaatcctgctcaactttacaca
acttgtctatataccccctgataggccttcatgcagtcttcagcgagatgaagatgcgtagc
atacttg

La SEQ ID NO: 15 muestra una secuencia v2 formadora de horquilla YFP de ARN como se encuentra en pDAB110853. Las mayúsculas son la hebra de sentido YFP, las minúsculas subrayadas comprenden intrón de ST-LS1, las minúsculas no subrayadas son hebras antisentido de YFP.

ATGTCATCTGGAGCACTTCTCTTTCATGGGAAGATTCCTTACGTTGTGGAG
ATGGAAGGGAATGTTGATGGCCACACCTTTAGCATACGTGGGAAAGGCTACGGAGATGCCT
CAGTGGGAAAGgactagtaccggttgggaaaggtatgtttctgcttctacctttgatatat
atataataattatcactaattagtagtaatatagtatttcaagtatttttttcaaaataaa
agaatgtagtatatagctattgcttttctgtagtttataagtgtgtatattttaatttata
acttttctaatatatgaccaaaacatggtgatgtgcaggttgatccgcggttactttccca
ctgaggcatctccgtagcctttcccacgtatgctaaaggtgtggccatcaacattcccttc
catctccacaacgtaaggaatcttcccatgaaagagaagtgctccagatgacat

La SEQ ID NO: 16 muestra una secuencia de ADN que comprende un intrón de ST- LS1.

La SEQ ID NO: 17 muestra una secuencia codificadora de YFP como se encuentra en pDAB110556.

La SEQ ID NO: 18 muestra una secuencia de ADN de región 1 de Anexina.

La SEQ ID NO: 19 muestra una secuencia de ADN de región 2 de Anexina.

La SEQ ID NO: 20 muestra una secuencia de ADN de región 1 de Beta Espectrina 2.

La SEQ ID NO: 21 muestra una secuencia de ADN de región 2 de Beta Espectrina 2.

La SEQ ID NO: 22 muestra una secuencia de ADN de región 1 de mtRP-L4.

La SEQ ID NO: 23 muestra una secuencia de ADN de región 2 de mtRP-L4.

Las SEQ ID NOs: 24-47 muestran cebadores utilizados para amplificar regiones del gen de Anexina, Beta Espectrina 2, mtRP-L4 e YFP para la síntesis de ARNds.

La SEQ ID NO: 48 muestra una secuencia de ADN de maíz que codifica una proteína tipo TIP41.

La SEQ ID NO: 49 muestra una secuencia de ADN de T20NV oligonucleótido.

Las SEQ ID NOs: 50-54 muestran cebadores y sondas utilizadas para medir los niveles de transcripción del maíz.

La SEQ ID NO: 55 muestra una secuencia de ADN de una porción de una región codificadora de SpecR usada para la detección de la troncal del vector binario.

La SEQ ID NO: 56 muestra una secuencia de ADN de una porción de una región codificadora de AAD1 usada para el análisis del número de copia genómica.

La SEQ ID NO: 57 muestra una secuencia de ADN de un gen invertasa de maíz.

Las SEQ ID NOs: 58-69 muestran secuencias de cebadoras y sondas utilizadas para el análisis de los números

de copia genética.

La SEQ ID NOs: 70-111 muestran las secuencias de transcripción de *Diabrotica* que codifican proteínas con homología de secuencia a SEQ ID NO: 2 por medio de un dominio de Sec1.

Las SEQ ID NOs: 112 y 113 muestran cebadores utilizados para amplificar las porciones de una secuencia de rop de *Diabrotica* que comprende rop v3 (región v3).

La SEQ ID NO: 114 muestra una secuencia de ADN de rop de región V3 de *Diabrotica virgifera* (rop V3) que fue utilizada para la síntesis *in vitro* de ARNds (las secuencias de promotor de T7 en extremos 5' y 3' no se muestran).

La SEQ ID NO: 115 muestra una secuencia de ADN de rop de chinche marrón neotropical (*Euschistus heros*).

La SEQ ID NO: 116 muestra una proteína ROP de *Euschistus heros*.

Law SEQ ID NO: 117 y 118 muestran cebadores utilizados para amplificar una porción de una secuencia de rop de *Euschistus heros* que comprende BSB_rop reg1.

La SEQ ID NO: 119 muestra una secuencia de ADN de BSB_rop reg1

La SEQ ID NO: 120 muestra una secuencia de ADN que comprende rop de *Meligethes aeneus*.

La SEQ ID NO: 121 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína ROP de *Meligethes aeneus*.

La SEQ ID NO: 122 muestra una secuencia de ADN que comprende rop de *Meligethes aeneus*.

La SEQ ID NO: 123 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína ROP de *Meligethes aeneus*.

La SEQ ID NO: 124 muestra una secuencia de ADN que comprende rop de *Meligethes aeneus*.

La SEQ ID NO: 125 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína ROP de *Meligethes aeneus*.

La SEQ ID NO: 126 muestra una secuencia de ADN que comprende rop de *Meligethes aeneus*.

La SEQ ID NO: 127 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína ROP de *Meligethes aeneus*.

La SEQ ID NO: 128 muestra una secuencia de ADN de rop de reg1 (región 1) de *Meligethes aeneus* que fue utilizada para la síntesis *in vitro* de ARNds (las secuencias de promotor de T7 en los extremos 5' y 3' no se muestran).

SEQ ID NOs: 129 y 130 muestran cebadores utilizados para amplificar las porciones de una secuencia de rop de *Meligethes* que comprende rop reg1 (región 1).

SEQ ID NO: 131 muestra una secuencia de ADN que comprende rop 1 de *Meligethes aeneus*.

SEQ ID NO: 132 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína de ROP-1 de *Meligethes aeneus*.

SEQ ID NO: 133 muestra una secuencia de ADN que comprende rop 2 de *Meligethes aeneus*.

SEQ ID NO: 134 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína de ROP 2 de *Meligethes aeneus*.

MODO(S) PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

En este documento se divulgan métodos y composiciones para el control de infestaciones de plagas de coleópteros y/o hemípteros. También se proporcionan métodos para identificar uno o más genes esenciales para el ciclo de vida de una plaga de coleópteros y/o hemípteros para uso como un gen objetivo del control mediado por ARNi de una población de plagas de coleópteros y/o hemípteros. Los vectores de plásmido de ADN que codifican una o más moléculas de ARNds pueden estar diseñadas para suprimir uno o más genes objetivo esenciales para el crecimiento, la supervivencia, desarrollo y/o reproducción. En algunas modalidades, se proporcionan métodos para represión post transcripcional de la expresión o inhibición de un gen objetivo mediante moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una secuencia codificante o no codificante del gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En estas y otras modalidades, una plaga de coleópteros y/o hemípteros puede ingerir una o más moléculas de ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi o ARNhp transcritas de todas o de una porción de una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia codificante o no codificante de un gen objetivo, de tal modo proporcionando un efecto protector a la planta.

Por lo tanto, algunas modalidades implican la inhibición específica de secuencia de expresión de productos génicos objetivo, utilizando dsRNA, ARNsi, ARNsh, ARNmi y/o ARNhp que es complementaria a las secuencias de codificación

y/o no codificante de los genes objetivo para lograr por lo menos el control parcial de una plaga de coleópteros y/o hemípteros. Se divulga un conjunto de moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas que comprende una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, como se establece en cualquiera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:131, y SEQ ID NO:133, y fragmentos de las mismas. En algunas modalidades, una molécula de ARNds estabilizada puede expresarse de esta secuencia, fragmentos de la misma o un gen que comprende una de estas secuencias, para el silenciamiento o inhibición post transcripcional de un gen objetivo. En ciertas modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de la SEQ ID NO: 1. En otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de la SEQ ID NO: 3. En otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de la SEQ ID NO: 4. En otras modalidades más, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de la SEQ ID NO: 114. En otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de la SEQ ID NO: 115. En otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de las SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:131, o SEQ ID

NO:133.

Algunas modalidades involucran una célula huésped recombinante (por ejemplo, una célula vegetal) que tiene en su genoma al menos una secuencia de ADN recombinante que codifica al menos una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds). En modalidades particulares, la molécula de ARNds se puede producir cuando se ingiere por una plaga de coleópteros y/o hemípteros para post transcripcionalmente silenciar o inhibir la expresión de un gen objetivo en la plaga de coleópteros y/o hemípteros. La secuencia de ADN recombinante puede abarcar, por ejemplo, uno o más de cualquiera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133; fragmentos de cualquiera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133 o una secuencia parcial de un gen que comprende una o más de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:119 SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133; o sus complementos.

Las modalidades particulares implican una célula huésped recombinante que tiene en su genoma una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica al menos una molécula de iRNA (por ejemplo, ARNds) que comprende todo o

parte de la SEQ ID NOs: 1, 115, 120, 122, 124, 126, 131, y/o 133. Cuando se ingiere por una plaga de coleópteros y/o hemípteros, la molécula de ARNi puede silenciar o inhibir la expresión de un gen objetivo compuesto por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133, en la plaga de coleópteros y/o hemípteros y así dar lugar al cese de crecimiento, desarrollo, reproducción y/o alimentación en la plaga de coleópteros y/o hemípteros.

En algunas modalidades, una célula huésped recombinante que tiene al menos una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica por lo menos una molécula de ARNds en su genoma puede ser una célula vegetal transformada. Algunas modalidades implican las plantas transgénicas que comprenden tal célula vegetal transformada. Además de estas plantas transgénicas, las plantas de la progenie de cualquier generación de planta transgénica, semillas transgénicas y productos vegetales transgénicos, son siempre provistas, cada una de los cuales se compone de secuencias de ácido nucleico recombinante. En modalidades particulares, una molécula de ARNds de la invención puede expresarse en una célula vegetal transgénica. Por lo tanto, en estas y otras modalidades, una molécula de ARNds de la invención puede ser aislada de una célula vegetal transgénica. En modalidades particulares, la planta transgénica es una planta seleccionada del grupo que comprende maíz (*Zea mays*), soya (*Glycine max*) y plantas de la

familia *Poaceae*.

Algunas modalidades implican un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de plaga de coleópteros y/o hemípteros. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico puede ser proporcionada, en donde la molécula de ácido nucleico se compone de una secuencia de nucleótidos que codifican una molécula de ARNds. En modalidades particulares, una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARNds podría relacionarse operativamente a un promotor y también puede estar operativamente vinculada con una secuencia de terminación de transcripción. En modalidades particulares, un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de plaga de coleópteros y/o hemípteros puede incluir: (a) transformar una célula vegetal con un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARNds; (b) cultivar la célula vegetal transformada en condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo de célula vegetal que comprende una pluralidad de células vegetales transformadas; (c) seleccionar una célula vegetal transformada que tiene integrado el vector en su genoma; y (d) determinar que la célula vegetal transformada seleccionada comprende la molécula de ARNds codificada por la secuencia de nucleótidos del vector. Una planta puede ser regenerada a partir de una célula vegetal que tiene integrado en su genoma del vector y comprende la molécula de ARNds codificada por la secuencia de nucleótidos del vector.

Por lo tanto, también se divulga una planta transgénica que comprende un vector con una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARNds integrada en su genoma, en donde la planta transgénica comprende la molécula de ARNds codificada por la secuencia de nucleótidos del vector. En modalidades particulares, la expresión de una molécula de ARNds en la planta es suficiente para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de una plaga de coleópteros y/o hemípteros que entra en contacto con la planta transformada o la célula vegetal, por ejemplo, al alimentarse de la planta transformada, una parte de la planta (por ejemplo, raíz) o célula vegetal. Las plantas transgénicas divulgadas en este documento pueden mostrar resistencia o tolerancia mejorada a plagas de coleópteros y/o hemípteros. Las plantas transgénicas particulares pueden mostrar resistencia y/o tolerancia mejorada a una o más plagas de coleópteros y/o hemípteros seleccionadas del grupo que consiste de: WCR; NCR; SCR; MCR; *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella; D. u. undecimpunctata* Mannerheim, *Meligethes aeneus* Fabricius, *Euchistus heros*, *Piezodorus guildinii*, *Halyomorpha halys*, y *Nezara viridula*, *Acrosternum hilare*, y *Euschistus servus*.

También se divulgan en este documento métodos para la administración de agentes de control, tales como una molécula de iRNA, a una plaga de coleópteros y/o hemípteros. Dichos agentes de control pueden causar, directa o indirectamente, un deterioro en la capacidad de la plaga de

coleópteros y/o hemípteros para alimentarse, crecer o de lo contrario dañar a un huésped. En algunas modalidades, un método para inhibir la expresión de un gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros puede resultar en el cese del hábito de crecimiento, desarrollo, reproducción y alimentación en la plaga de coleópteros y/o hemípteros. En algunas modalidades, el método puede eventualmente resultar en la muerte de la plaga de coleópteros y/o hemípteros.

En algunas modalidades, se proporcionan composiciones (por ejemplo, una composición tópica) que comprenden una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds) de la invención para el uso en plantas, animales y/o el medio ambiente de una planta o un animal para lograr la eliminación o reducción de una infestación de plagas de coleópteros y/o hemípteros. En modalidades particulares, la composición puede ser una fuente de composición nutricional o de alimentos para alimentar a la plaga de coleópteros y/o hemípteros. Algunas modalidades comprenden poner la composición de fuente nutricional o de alimentos a disposición de la plaga de coleópteros y/o hemípteros. La ingestión de una composición que comprende moléculas de ARNi puede resultar en la absorción de las moléculas por una o más células de la plaga de coleópteros y/o hemípteros, que puede a su vez resultar en la inhibición de la expresión de al menos un gen objetivo en células de la plaga de coleópteros y/o hemípteros. La ingestión de o el daño a una planta o célula vegetal por una plaga de coleópteros y/o hemípteros puede ser limitada o

eliminada en o sobre cualquier tejido huésped o entorno en el que está presente la plaga de coleópteros y/o hemípteros proporcionando una o varias composiciones que comprenden una molécula de ARNi de la invención en el huésped de la plaga de coleópteros y/o hemípteros.

Las composiciones y métodos aquí divulgados pueden utilizarse juntos en combinaciones con otras composiciones y métodos para el control de daños por plagas de coleópteros y/o hemípteros. Por ejemplo, una molécula de ARNi como se describe en este documento para proteger las plantas contra plagas de coleópteros y/o hemípteros podrá ser utilizada en un método que comprende el uso adicional de uno o más agentes químicos eficaces contra una plaga de coleópteros y/o hemípteros, bioplaguicidas eficaces contra una plaga de coleópteros y/o hemípteros, la rotación de cultivos o técnicas genéticas recombinantes que presentan características diferentes de las características de los métodos mediados por ARNi y las composiciones de ARNi de la invención (por ejemplo, la producción recombinante de proteínas en las plantas que son perjudiciales para una plaga de coleópteros y/o hemípteros (por ejemplo, toxinas Bt)).

II. Abreviaturas

ARNds un ácido ribonucleico en donde al menos una parte del ácido ribonucleico es de doble hebra.

GI Inhibición del crecimiento

NCBI Centro Nacional de Información biotecnológica

ADNg ADN genómico

ARNi Ácido ribonucleico inhibidor

ORF Marco de lectura abierta

ARNi Interferencia del ácido ribonucleico

ARNmi Micro ácido ribonucleico

ARNsi ácido ribonucleico interferente corto

ARNsh ácido ribonucleico de horquilla corta

ARNhp ácido ribonucleico que contiene horquilla

UTR Región sin traducir

WCR crisomela del maíz del oeste (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte)

NCR crisomela del maíz del norte (*Diabrotica barberi* Smith y Lawrence)

MCR crisomela del maíz mexicana (*Diabrotica virgifera zeae* Krysan y Smith)

PCR Reacción en cadena de polimerasa

RISC Complejo silenciador inducido por ARN

SCR Crisomela de maíz del sur (*Diabrotica undecimpunctata* howardi Barber)

BSB chinche marrón neotropical (*Euschistus heros* Fabricius)

PB Escarabajo del polen (*Meligethes aeneus* Fabricius)

III. Términos

En la descripción y las tablas que siguen, se utilizan una serie de términos. Con el fin de proporcionar

una comprensión clara y consistente de la descripción y reivinidicaciones, incluyendo el ámbito para que dichos términos se den, se proporcionan las siguientes definiciones:

Plaga de Coleópteros: Como se utiliza en este documento, el término "plaga de coleópteros" se refiere a los insectos del género *Diabrotica*, que se alimentan de maíz y otras gramíneas verdaderas. En ejemplos particulares, una plaga de coleópteros es seleccionada de la lista que comprende *D. v. virgifera* LeConte (WCR); *D. Barberi* Smith y Lawrence (NCR); *D. u. howardi* (SCR); *D. v. zeae* (MCR); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; *D. u. undecimpunctata* Mannerheim; y *Meligethes aeneus* Fabricius.

Plaga de Hemípteros: Como se utiliza en este documento, el término "plaga de hemípteros" se refiere a los insectos de la familia *Pentatomidae*, que se alimentan de gran variedad de plantas hospederas y tienen piezas bucales penetrantes y succionadoras. En ejemplos particulares, la plaga de hemípteros se selecciona de la lista que comprende, *Euschistus heros* (Fabr.) (chinche marrón Neotropical), *Nezara viridula* (L.) (chinche verde del sur), *Piezodorus guildinii* (Westwood) (chinche de banda roja) *Halyomorpha halys* chinche marrón marmotada, *Acrosternum hilare* (chinche verde) y *Euschistus servus* (chinche marrón).

Contacto (con un organismo): Como se utiliza aquí, el término "contacto con" o "absorción por" un organismo (por ejemplo, una plaga de coleópteros y/o hemípteros), con respecto a una molécula de ácido nucleico, incluye la

internalización de la molécula de ácido nucleico en el organismo, por ejemplo y sin limitación: ingestión de la molécula por el organismo (por ejemplo, por alimentación); contactar al organismo con una composición que comprende la molécula de ácido nucleico; y empapar a los organismos con una solución que comprende la molécula de ácido nucleico.

Cóntigo: Como se utiliza en este documento, el término "cóntigo" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es reconstruida a partir de un conjunto de segmentos de ácido nucleico que se superponen derivados de una sola fuente genética.

Planta de maíz: Como se utiliza en este documento, el término "planta de maíz" se refiere a una planta de la especie *Zea mays* (maíz).

ARNds de codificación: Como se utiliza en este documento, el término "ARNds de codificación" incluye un gen cuyo producto de la transcripción del ARN es capaz de formar una estructura de ARNds intramolecular (por ejemplo, una horquilla) o una estructura de ARNds intermolecular (por ejemplo, por hibridación a una molécula de ARN objetivo).

Expresión: Como se utiliza en este documento, "expresión" de una secuencia (por ejemplo, un gen o un transgen) se refiere al proceso por el cual la información codificada de una unidad transcripcional de ácidos nucleicos (incluyendo, por ejemplo, ADN genómico o ADNc) se convierte en una parte de una célula, a menudo incluyendo la síntesis de una proteína estructural, operacional o no operacional. La

expresión génica puede ser influenciada por señales externas; por ejemplo, la exposición de un célula, tejido u organismo a un agente que aumenta o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen puede ser regulada en cualquier lugar en el camino del ADN al ARN a la proteína. La regulación de la expresión génica ocurre, por ejemplo, a través de controles que actúan sobre la transcripción, traducción, transporte y procesamiento del ARN, la degradación de las moléculas intermediarias como ARNm, o a través de la activación, inactivación, compartimentación o degradación de las moléculas de proteína específica después de que se han hecho, o por combinaciones de las mismas. La expresión génica puede medirse en el nivel del ARN o el nivel de proteína por cualquier método conocido en la técnica incluyendo, sin limitación, northern blot (ARN), RT PCR, western (inmuno) blot, o ensayo(s) de actividad de proteína *in vitro*, *in situ* o *in vivo*.

Material genético: Como se utiliza en este documento, el término "material genético" incluye todos los genes y moléculas de ácido nucleico, como ADN y ARN.

Inhibición: Como se utiliza en este documento, el término "inhibición", cuando se utiliza para describir un efecto sobre una secuencia codificante (por ejemplo, un gen), se refiere a una disminución apreciable en el nivel celular de ARNm transcrito de la secuencia codificante y/o péptido, polipéptido o producto de proteína de la secuencia codificante. En algunos ejemplos, la expresión de una

secuencia codificante puede ser inhibida de tal manera que la expresión sea casi eliminada. "Inhibición específica" se refiere a la inhibición de la secuencia codificante objetivo sin afectar consecuentemente la expresión de otras secuencias de codificación (por ejemplo, genes) en la célula en donde se está llevando a cabo la inhibición.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o proteína) ha sido sustancialmente separado, producido aparte de o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en la que el componente ocurre naturalmente (es decir, otros ADN y ARN cromosómico y extra cromosómico, y proteínas). Las moléculas de ácido nucleico y proteínas que han sido "aisladas" incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas por métodos de purificación estándar. El término también abarca los ácidos nucleicos y las proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula huésped, así como moléculas de ácido nucleico químicamente sintetizadas, proteínas y péptidos.

Molécula de ácido nucleico: Como se utiliza en este documento, el término "molécula de ácido nucleico" puede referirse a una forma polimérica de nucleótidos, que pueden incluir hebras sentido y anti sentido hebras de ARN, ADNc, ADN genómico y formas sintéticas y polímeros mixtos de los anteriores. Un nucleótido puede referirse a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una "molécula de ácido

nucleico", como se usa en este documento, es sinónimo de "ácido nucleico" y "polinucleótido." Una molécula de ácido nucleico es generalmente de por lo menos 10 bases de longitud, a menos que se especifique lo contrario. Por convención, la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico se lee desde el extremo 5' al extremo 3' de la molécula. El "complemento" de una secuencia de nucleótidos se refiere a la secuencia, de 5' a 3', de las nucleobases que forman pares de bases con las nucleobases de la secuencia de nucleótidos (es decir, A-T/U y G-C). El "complemento inverso" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a la secuencia, de 3' a 5', de las nucleobases que forman pares de bases con las nucleobases de la secuencia de nucleótidos.

"Moléculas de ácido nucleico" incluyen formas de hebra sencilla y doble de ADN; formas de hebra sencilla de ARN; y formas de hebra doble de ARN (ARNds). El término "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a las hebras sentido y antisentido de un ácido nucleico como hebras sencillas individuales o dúplex. El término "ácido ribonucleico" (ARN) incluye ARNi (RNA inhibidor), ARNds (RNA doble hebra), ARNsi (ARN interferente corto), , ARNsh (ARN de horquilla corta), ARNm (ARN mensajero), ARNmi (microARN), ARNhp (ARN de horquilla), ARNt (ARN de transferencia, cargado o descargado con un aminoácido acilado correspondiente) y ARNc (ARN complementario). El término "ácido desoxirribonucleico" (ADN) es inclusivo de ADNc, ADN genómico e híbridos de ADN-ARN. Los términos

"segmento del ácido nucleico" y "segmento de secuencia de nucleótidos" o más generalmente "segmento", se entenderá por aquellos en la técnica como un término funcional que incluye las secuencias genómicas, secuencias de ARN ribosómico, secuencias de ARN de transferencia, secuencias de ARN mensajero, secuencias operón y pequeñas secuencias de nucleótidos diseñadas que codifican o pueden ser adaptadas para codificar péptidos , polipéptidos o proteínas.

Oligonucleótido: Un oligonucleótido es un polímero de ácido nucleico corto. Los oligonucleótidos pueden formarse por escisión de segmentos de ácido nucleico más largos, o polimerizando los precursores de nucleótidos individuales. Los sintetizadores automatizados permiten la síntesis de oligonucleótidos hasta varios cientos de bases de longitud. Debido a que los oligonucleótidos pueden unirse a una secuencia de nucleótidos complementaria, se puede utilizar como sondas para la detección de ADN o ARN. Los oligonucleótidos compuestos de ADN (oligodesoxiribonucleótidos) pueden utilizarse en PCR, una técnica para la amplificación de secuencias de ADN y del ARN (transcripción inversa en un ADNc). En PCR, el oligonucleótido se conoce normalmente como un "cebador", que permite que una polimerasa de ADN extienda el oligonucleótido y replique la hebra complementaria.

Una molécula de ácido nucleico puede incluir uno o ambos nucleótidos de origen natural y modificados enlazados mediante vínculos del nucleótido de ocurrencia natural y/o no

natural. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser modificadas químicamente o bioquímicamente, o pueden contener bases nucleótidas naturales o derivatizadas, como será apreciado fácilmente por las personas versadas en la técnica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos de ocurrencia natural con un análogo, modificaciones internucleótidas (por ejemplo, vínculos sin carga: por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc..; vínculos cargados: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc..; fracciones pendientes: por ejemplo, péptidos; intercaladores: por ejemplo, acridina, psoralen, etc..; quelantes; alquilantes; y vínculos modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.). El término "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier conformación topológica, incluyendo conformaciones de hebra sencilla, hebra doble, parcialmente duplicadas, triplexadas, horquilladas, circulares y con candado.

Como se utiliza en el presente, con respecto al ADN, el término "secuencia codificante", "codificación de secuencia", "secuencia de nucleótidos estructural", o "molécula de ácido nucleico estructural" se refiere a una secuencia de nucleótidos que en última instancia se traduce en un polipéptido, mediante transcripción y ARNm, estando bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Con respecto al ARN, el término "secuencia codificante" se

refiere a una secuencia de nucleótidos que se traduce en un péptido, polipéptido o proteína. Los límites de una secuencia codificante son determinados por un codón de inicio de traducción en el terminal 5' y un codón de detención de traducción en el terminal 3'. Las secuencias de codificación incluyen, pero no se limitan a: ADN genómico; ADNc; EST; y secuencias de nucleótidos recombinantes.

Genoma: Como se utiliza en este documento, el término "genoma" se refiere al ADN cromosómico encontrado dentro del núcleo de una célula y también se refiere a ADN de organelas encontrado dentro de los componentes subcelulares de la célula. En algunas modalidades de la invención, una molécula de ADN puede introducirse en una célula vegetal de tal manera que la molécula de ADN se integra en el genoma de la célula vegetal. En estas y otras modalidades, la molécula de ADN puede o bien integrarse en el ADN nuclear de la célula vegetal, o integrado en el ADN del cloroplasto o mitocondria de la célula vegetal. El término "genoma" como se aplica a las bacterias se refiere al cromosoma y plásmidos dentro de la célula bacteriana. En algunas modalidades de la invención, una molécula de ADN puede introducirse en una bacteria de tal manera que la molécula de ADN se integra en el genoma de la bacteria. En estas y otras modalidades, la molécula de ADN puede ser cromosómicamente integrada o localizada o en un plásmido estable.

Identidad de secuencia: El término "identidad de secuencia" o "identidad" como se utiliza en este documento,

en el contexto de dos ácidos nucleicos o secuencias de polipéptido, se refiere a los residuos en las dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para la máxima correspondencia sobre una ventana de comparación específica.

Como se utiliza en este documento, el término "porcentaje de identidad de secuencia" puede referirse al valor determinado mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico o secuencias de polipéptido) sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede abarcar adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones compensadas en donde se da el residuo de nucleótido o aminoácido idéntico en ambas secuencias para arrojar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Una secuencia que es idéntica en cada posición en comparación con una secuencia de referencia se dice que es 100% idéntica a la secuencia de referencia y viceversa.

Los métodos para alinear las secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Varios programas y algoritmos de alineación se describen en, por

ejemplo: Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* E.U.A. 85:2444; Higgins y Sharp (1988) *Gene* 73:237 244; Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5:151 153; Corpet et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881 10890; Huang et al. (1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-165; Pearson et al. (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331; Tatiana et al. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-250. Un examen detallado de los métodos de alineación de secuencia y cálculos de homología puede encontrarse en, por ejemplo, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

La Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (BLAST™; Altschul et al. (1990)) está disponible en varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional de Información Biotecnológica (Bethesda, MD) y en Internet, para su uso en relación con varios programas de análisis de secuencia. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia utilizando este programa está disponible en Internet en la sección "ayuda" para BLAST™. Para las comparaciones de secuencias de ácido nucleico, se puede emplear la función "secuencias Blast 2" del programa BLAST™ (Blastn) utilizando la matriz de BLOSUM62 por defecto con la configuración predeterminada. Las secuencias de ácido nucleico con aún mayor semejanza con las secuencias de referencia mostrarán creciente porcentaje de identidad cuando se evalúen mediante este método.

Específicamente hibridable/Específicamente complementaria: Como se utiliza en este documento, los términos "Específicamente hibridable" y "Específicamente complementaria" son términos que indican un grado suficiente de complementariedad tal que el enlace estable y específico se produce entre la molécula de ácido nucleico y una molécula de ácido nucleico objetivo. La hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico consiste en la formación de una alineación anti paralela entre las secuencias de ácido nucleico de las dos moléculas de ácido nucleico. Las dos moléculas son entonces capaces de formar enlaces de hidrógeno con las bases correspondientes en la hebra opuesta para formar una molécula de dúplex que, si es lo suficientemente estable, es detectable mediante métodos conocidos en la técnica. Una molécula de ácido nucleico no necesita ser 100% complementaria a la secuencia objetivo para ser específicamente hibridable. Sin embargo, la cantidad de complementariedad de la secuencia que debe existir para que la hibridación sea específico es una función de las condiciones de hibridación utilizadas.

Las condiciones de hibridación, resultantes en particulares grados de exigencia, variará dependiendo de la naturaleza del método de hibridación de elección y la composición y la longitud de las secuencias de ácido nucleico hibridantes. En general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{++}) de la hibridación determinará el rigor de la hibridación. La

fuerza iónica de la solución de lavado y la temperatura de lavado también influyen en la exigencia. Los cálculos sobre las condiciones de hibridación requeridas para alcanzar grados particulares de exigencia son conocidos por las personas de conocimientos ordinarios en la técnica y se comentan, por ejemplo, en Sambrook et al. *(ed.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 2a. ed., vol. 1 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, capítulos 9 y 11, y actualizaciones; y Hames y Higgins (eds.) *Nucleic Acid Hybridization,* IRL Press, Oxford, 1985. Instrucciones y orientación más detalladas con respecto a la hibridación de ácidos nucleicos pueden encontrarse, por ejemplo, en Tijssen, "*Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays*," en *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with Nucleic Acid Probes,* parte I, capítulo 2, Elsevier, Nueva York, 1993; Ausubel et al., Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo 2, Greene Publishing and Wiley Interscience, NY, 1995, y actualizaciones.

Como se utiliza en este documento, "condiciones estrictas" abarca las condiciones bajo las cuales se producirá la hibridación solo si hay más de 80% de secuencia coincidente entre la molécula de hibridación y una secuencia homóloga dentro de la molécula de ácido nucleico objetivo. "Condiciones estrictas" incluye niveles más particulares de exigencia. Por lo tanto, como se utiliza en este documento, condiciones de "exigencia moderada" son aquellas bajo las

cuales las moléculas con más del 80% de secuencia coinciden (por ejemplo, tienen menos de 20% desajuste) hibridarán; las condiciones de "alta exigencia" son aquellas bajo las cuales las secuencias con más del 90% (es decir, tienen menos de 10% de desajuste) hibridarán; y las condiciones de "exigencia muy alta" son aquellas bajo las cuales las secuencias con más del 95% de coincidencia (es decir, tienen menos de 5% de desajuste) hibridarán.

Las siguientes son condiciones de hibridación no limitantes, representativas:

Condición de alta exigencia (detecta secuencias que comparten al menos el 90% de identidad de secuencia): Hibridación en tampón 5X SSC a 65°C durante 16 horas; lavar dos veces en tampón 2X SSC a temperatura ambiente durante 15 minutos cada una; y lavar dos veces en tampón 0.5X SSC a 65°C por 20 minutos cada una.

Condición de exigencia moderada (detecta secuencias que comparten al menos el 80% de identidad de secuencia): Hibridación en tampón 5X a 6X SSC a 65-70°C durante 16-20 horas; lavar dos veces en tampón 2X SSC a temperatura ambiente durante 5-20 minutos cada una; y lavar dos veces en tampón 1X SSC a 55-70°C por 30 minutos cada una.

Condición de control no exigente (las secuencias que compartan al menos el 50% de la identidad de secuencia hibridarán): Hibridación en tampón 6X SSC a temperatura de 55°C durante 16-20horas; lavar por lo menos dos veces en tampón 2X a 3X SSC a temperatura ambiente de 55°C por 20-30

minutos cada uno.

En este documento, el término "sustancialmente homólogo" u "homología sustancial," con respecto a una secuencia de ácido nucleico contigua, se refiere a las secuencias de nucleótidos contiguas que son sufragadas por moléculas de ácido nucleico que hibridan bajo condiciones estrictas a una molécula de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico de referencia. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico con secuencias sustancialmente homólogas a una secuencia de ácido nucleico de referencia SEQ ID NO: 1 son aquellas moléculas de ácido nucleico que hibridan bajo condiciones exigentes (por ejemplo, las condiciones de exigencia moderada establecidas, supra) a moléculas de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico de referencia SEQ ID NO: 1. Las secuencias sustancialmente homólogas pueden tener al menos el 80% de la identidad de la secuencia. Por ejemplo, las secuencias sustancialmente homólogas pueden tener de aproximadamente 80% a 100% de identidad de secuencia, tal como aproximadamente 81%; aproximadamente 82%; aproximadamente 83%; aproximadamente 84%; aproximadamente 85%; aproximadamente 86%; aproximadamente 87%; aproximadamente 88%; aproximadamente 89%; aproximadamente 90%; aproximadamente 91%; aproximadamente 92%; aproximadamente 93%; aproximadamente 94% aproximadamente 95%; aproximadamente 96%; aproximadamente 97%; aproximadamente 98%; aproximadamente 98,5%; aproximadamente 99%; aproximadamente 99,5%; y aproximadamente 100%. La propiedad

de homología substancial está estrechamente relacionada con la hibridación específica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico es específicamente hibridable cuando hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del ácido nucleico a secuencias no objetivo en condiciones donde se desea unión específica, por ejemplo, bajo condiciones de hibridación exigentes.

Como se utiliza en este documento, el término "ortólogo" se refiere a un gen en dos o más especies que ha evolucionado desde una secuencia de nucleótidos ancestral común y puede conservar la misma función en las dos o más especies.

Como se utiliza en este documento, se dice que dos moléculas de secuencia de ácido nucleico muestran "complementariedad completa" cuando todos los nucleótidos de una secuencia leídos en la dirección de 5' a 3' son complementarios a cada nucleótido de la otra secuencia cuando se lee en la dirección de 3' a 5'. Una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de referencia mostrará una secuencia idéntica a la secuencia inversa de complemento de la secuencia de nucleótidos de referencia. Estos términos y descripciones están bien definidos en la técnica y son fácilmente entendidos por los expertos en la técnica.

Operativamente vinculados: Una primera secuencia de nucleótido está operativamente vinculada con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de

ácido nucleico se encuentra en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Cuando se producen por vía recombinante, las secuencias de ácido nucleico operativamente vinculadas son generalmente contiguas y, en caso necesario, dos regiones de codificación de proteína pueden unirse en el mismo marco de lectura (por ejemplo, en una ORF traslacionalmente fundida). Sin embargo, los ácidos nucleicos no necesitan ser contiguos para vincularse operativamente.

El término, "operativamente vinculado", cuando se utiliza en referencia a una secuencia de reglamentación y una secuencia codificante, significa que la secuencia reglamentaria afecta a la expresión de la secuencia codificante vinculada. "Secuencias reguladoras", o "elementos de control," se refiere a las secuencias de nucleótidos que influyen en el momento y nivel/cantidad de transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores; secuencias de traducción líder; intrones; potenciadores; estructuras en tallo-bucle; secuencias vinculantes represoras; secuencias de terminación; secuencias de reconocimiento de poliadenilación; etc. Las secuencias reguladoras particulares pueden estar situadas hacia arriba y/o hacia abajo de una secuencia codificante operativamente vinculada a las mismas. Además, las secuencias reguladoras particulares operativamente vinculadas a la secuencia codificante pueden encontrarse en la hebra

complementaria asociada de una molécula de doble hebra de ácido nucleico.

Promotor: Como se utiliza en este documento, el término "promotor" se refiere a una región del ADN que puede ser ascendente desde el inicio de la transcripción, y que puede estar involucrado en el reconocimiento y unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un promotor puede estar operativamente vinculado con una secuencia codificante para la expresión en una célula o un promotor puede estar operativamente vinculado con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de señales que puede ser operativamente vinculada a la secuencia codificante para la expresión en una célula. Un "promotor de planta" puede ser un promotor capaz de iniciar la transcripción en las células de la planta. Ejemplos de promotores bajo desarrollo controlado promotores que inician preferentemente la transcripción en ciertos tejidos, tales como hojas, raíces, semillas, fibras, vasos del xilema, traqueidas o esclerénquima. Tales promotores se denominan de "tejido preferido." Los promotores que inician la transcripción solamente en ciertos tejidos son referidos como "tejido específico." Un promotor "tipo celular específico" principalmente activa la expresión en ciertos tipos de células en uno o más órganos, por ejemplo, las células vasculares en las raíces o las hojas. Un promotor "inducible" puede ser un promotor que puede estar bajo el control del medio ambiente. Ejemplos de condiciones ambientales que

pueden iniciar la transcripción por promotores inducibles incluyen condiciones anaeróbicas y la presencia de luz. Los promotores de tejido específico, tejido preferido, tipo celular específico e inducibles constituyen la clase de los promotores "no constitutivos". Un promotor "constitutivo" es un promotor que puede ser activo en la mayoría de condiciones ambientales o en muchos tipos de tejido o célula.

Puede utilizarse cualquier promotor inducible en algunas modalidades de la invención. Ver Ward et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:361-366. Con un promotor inducible, aumenta la tasa de transcripción en respuesta a un agente inductor. Los promotores inducibles ejemplares incluyen, pero no se limitan a: Promotores del sistema ACEI que responden a cobre; genes *In2* del maíz que responden a fitoprotectores de herbicida de bencenosulfonamida; Represor Tet de Tn10; y el promotor inducible de un gen de la hormona esteroide, la actividad transcripcional de los cuales puede ser inducida por una hormona con glucocorticosteroides (Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* E.U.A. 88:10421-10425).

Los promotores constitutivos ejemplares incluyen, pero no se limitan a: Promotores de virus de plantas, como el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV); promotores de genes de la actinia de arroz; promotores de ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 maíz; y el promotor de ALS, *Xba1/NcoI* fragmento 5' del gen estructural *Brassica napus ALS3* (o una secuencia de nucleótidos similar a dicho fragmento *Xba1/NcoI*) (Patente estadounidense No.

5,659,026).

Además, puede utilizarse cualquier promotor de tejido específico o tejido preferido en algunas modalidades de la invención. Las plantas transformadas con una molécula de ácido nucleico que comprenden una secuencia codificante operativamente vinculada a un promotor específico del tejido pueden producir el producto de la secuencia codificante exclusiva o preferencial, en un tejido específico. Los promotores de tejido específico o de tejido preferido ejemplares incluyen, pero no se limitan a: Un promotor preferido de semilla, tal como la del gen faseolina; un promotor inducido por la luz y específico de las hojas, tal como de cabina o rubisco; un promotor específico de antera como el de LAT52; un promotor específico de polen como el de Zm13; y un promotor prefrido de microsporas como el de apg.

Planta de soya: Como se utiliza en este documento, el término "planta de soya" se refiere a una planta de la especie *Glycine SP.*, incluyendo *Glycine max*.

Transformación: Como se utiliza en este documento, el término "transformación" o "transducción" se refiere a la transferencia de una o más molécula(s) de ácido nucleico a una célula. Una célula se "es transformada" por una molécula de ácido nucleico que hizo transducción dentro de la célula cuando la molécula de ácido nucleico se convierte en establemente replicada por la célula, ya sea por la incorporación de la molécula de ácido nucleico en el genoma celular, o la replicación episomal. Como se utiliza en este

documento, el término "transformación" abarca todas las técnicas por las cuales una molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula como tal. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a: transfección con vectores virales; transformación con vectores plásmidos; electroporación (Fromm et al. (1986) *Nature* 319:791-793; *Lipofection* (Felgner et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* E.U.A. 84:7413-7417); *microinjection* (Mueller et al. (1978) *Cell* 15:579 585); *Agrobacterium mediated transfer* (Fraley et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* E.U.A. 80:4803-4807); *direct DNA uptake; and microprojectile bombardment* (Klein et al. (1987) *Nature* 327:70).

Transgen: Una secuencia de ácido nucleico exógena. En algunos ejemplos, un transgen puede ser una secuencia que codifica una o ambas hebra(s) de una molécula de ARNds que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una molécula de ácido nucleico en una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En otros ejemplos, un transgen puede ser una secuencia de ácido nucleico antisentido, en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico antisentido inhibe la expresión de una secuencia de ácido nucleico objetivo. En aún más ejemplos, un transgen puede ser una secuencia del gen (por ejemplo, un gen de resistencia a herbicidas), un gen que codifica un compuesto industrial o farmacéuticamente útil, o un gen que codifica un rasgo agrícola deseable. En estos y otros ejemplos, un transgen puede contener secuencias reguladoras (por ejemplo, un

promotor) operativamente vinculado a la secuencia codificante del transgen.

Vector: Una molécula de ácido nucleico como se introduce en una célula, por ejemplo, para producir una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que permiten su replicación en la célula huésped, tal como un origen de replicación. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a: un plásmido; cósmido; bacteriófago; o virus que lleva el ADN exógeno a una célula. Un vector también puede ser una molécula de ARN. Un vector también puede incluir uno o más genes, secuencias antisentidas, y/o genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, causando así que la célula exprese las moléculas de ácido nucleico y/o las proteínas codificadas por el vector. Un vector incluye opcionalmente materiales para ayudar a lograr la entrada de la molécula de ácido nucleico a la célula (por ejemplo, un liposoma, capa de proteína, etc.).

Rendimiento: Un rendimiento estabilizado de cerca del 100% o más en relación con la producción de variedades de revisión en el mismo lugar de crecimiento que crecen al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones. En modalidades particulares, "rendimiento mejorado" o "mejora de rendimiento" significa un cultivo que tiene un rendimiento estabilizado de 105 a 115% o mayor en relación con el rendimiento de las variedades revisadas en el mismo lugar que

contiene importantes densidades de plagas de coleópteros y/o hemípteros que son perjudiciales para ese cultivo que crece al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones.

A menos que esté específicamente indicado o implícito, los términos "un," "uno", "una", "el" y "la" significan "por lo menos uno," según lo utilizado en este documento.

A menos que se defina lo contrario en la presente, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenecen las enseñanzas de esta invención. Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en, por ejemplo, Lewin's Genes X, Jones & Bartlett Publishers, 2009 (ISBN 10 0763766321); Krebs et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0 632 02182 9); y Meyers R.A. (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1 56081 569 8). Todos los porcentajes son por peso y todas las proporciones de la mezcla de solvente son por volumen a menos que se indique lo contrario. Todas las temperaturas son en grados Celsius.

IV. Moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de plagas de coleópteros y/o hemípteros

A. Información General

En este documento se describen moléculas de ácido nucleico útiles para el control de plagas de coleópteros y/o hemípteros. Las moléculas de ácido nucleico descritas incluyen secuencias objetivo (por ejemplo, genes nativos y secuencias no codificantes), ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNhp y ARNmi. Por ejemplo, las moléculas de ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi o ARNhp que se describen en algunas modalidades pueden ser específicamente complementarias a la totalidad o parte de una o más secuencias de ácido nucleico nativo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En estas y otras modalidades, la(s) secuencia(s) de ácido nucleico nativa(s) puede(n) estar uno o más gen(es) objetivo, cuyos productos pueden ser, por ejemplo y sin limitación: implicados en un proceso metabólico; implicados en un proceso reproductivo; o implicados en el desarrollo larval. Las moléculas de ácido nucleico descritas, cuando se introducen en una célula que abarca por lo menos una secuencia de ácido nucleico nativa a la que las moléculas de ácido nucleico son complementarias, específicamente, puede iniciar el ARNi en la célula y por consiguiente reducir o eliminar la expresión de la(s) secuencia(s) de ácido nucleico nativa(s). En algunos ejemplos, la reducción o eliminación de la expresión de un gen objetivo por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia complementaria específicamente correspondiente puede ser letal en plagas de coleópteros y/o hemípteros o resultar en la reducción del crecimiento y/o reproducción.

En algunas modalidades, al menos un gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros puede ser seleccionado, en donde el gen objetivo comprende una secuencia de nucleótidos que comprende rop (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133). En ejemplos particulares, un gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros se selecciona, en donde el gen objetivo comprende una secuencia de nucleótidos nueva que comprende rop (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133).

En algunas modalidades, un gen objetivo puede ser una molécula de ácido nucleico formada por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos 85% idéntica (por ejemplo, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, aproximadamente 100%, o 100% idéntica) a la secuencia de aminoácidos de un producto de proteína de rop (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133). Un gen objetivo puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico en una plaga de coleópteros y/o hemípteros, la inhibición post transcripcional de los cuales tiene un efecto perjudicial sobre la plaga de coleópteros y/o hemípteros, o proporciona un beneficio protector contra la plaga de coleópteros y/o

hemípteros a una planta. En ejemplos particulares, un gen objetivo es una molécula de ácido nucleico formada por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos 85% idéntica, aproximadamente 90% idéntica, aproximadamente 95% idéntica, aproximadamente 96% idéntica, aproximadamente 97% idéntica, aproximadamente 98% idéntica, aproximadamente 99% idéntica, aproximadamente 100% idéntica, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un producto de proteína de secuencia de nucleótidos nueva SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133.

Siempre que según la invención sean secuencias de nucleótidos, cuya expresión de como resultado una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que es específicamente complementaria a la totalidad o parte de una molécula de ARN nativa que está codificada por una secuencia codificante en una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En algunas modalidades, después de la ingestión de la molécula de ARN expresada por una plaga de coleópteros y/o hemípteros, la regulación a la baja de la secuencia codificante en las células de la plaga de coleópteros y/o hemípteros puede obtenerse. En modalidades particulares, la regulación a la baja de la secuencia codificante en las células de la plaga de coleópteros y/o hemípteros puede resultar en un efecto perjudicial para el crecimiento, la viabilidad, la proliferación o la reproducción de la plaga de coleópteros

y/o hemípteros.

En algunas modalidades, las secuencias objetivo incluyen secuencias transcritas de ARN no codificante, tales como 5'UTRs; 3'UTRs; secuencias líder empalmadas; secuencias del intrón; secuencias de exón (por ejemplo, ARN de 5'UTR posteriormente modificado en empalme trans); las secuencias de donatron (por ejemplo, ARN no codificante requerido para proporcionar secuencias donantes para empalme trans); y otro ARN transcrito no codificante de genes objetivo de plagas de coleópteros y/o hemípteros. Estas secuencias pueden derivarse de ambos genes mono cistrónicos y poli cistrónicos.

Así, también se describen en este documento en relación con algunas modalidades las moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi y ARNhp) que comprenden al menos una secuencia de nucleótidos específicamente complementaria a la totalidad o parte de una secuencia objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En algunas modalidades una molécula de ARNi puede comprender secuencias de nucleótidos que son complementarias a la totalidad o parte de una pluralidad de secuencias objetivo; por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más secuencias objetivo. En modalidades particulares, la molécula de ARNi se puede producir *in vitro* o *in vivo* por un organismo modificado genéticamente, como una planta o una bacteria. También se divulgan secuencias de ADNc que pueden utilizarse para la producción de moléculas de ARNds, moléculas de ARNsi, moléculas de ARNsh , moléculas de ARNmi o moléculas de ARNhp

que son específicamente complementarias a la totalidad o parte de una secuencia objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros. Además se describen construcciones de ADN recombinante para su uso en el logro de la transformación estable de huéspedes objetivo particulares. Los huéspedes objetivo transformados pueden expresar niveles efectivos de moléculas de ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi o ARNhp de las construcciones de ADN recombinante. Por lo tanto, también se describe un vector de transformación de planta que comprende al menos una secuencia de nucleótidos operativamente vinculada a un promotor heterólogo funcional en una célula vegetal, en donde la expresión de la(s) secuencia(s) de nucleótidos resulta en una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria específicamente a la totalidad o parte de una secuencia de destino en una plaga de coleópteros y/o hemípteros.

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico útiles para el control de plagas de coleópteros y/o hemípteros pueden incluir: todo o parte de una secuencia de ácido nucleico nativa aislada de *Diabrotica*, *Meligethes* u organismo de hemípteros que comprende rop (por ejemplo, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133); secuencias de nucleótidos que cuando se expresan resultan en una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que es específicamente complementaria a la totalidad o parte de una molécula de ARN nativa que está

codificada por rop (por ejemplo, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133); moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi y ARNhp) que comprenden al menos una secuencia de nucleótidos específicamente complementaria a todo o parte de una secuencia codificante de rop (por ejemplo, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, or SEQ ID NO:133); secuencias de ADNc que pueden utilizarse para la producción de moléculas de ARNds, moléculas de ARNsi, moléculas de ARNmi o de ARNhp que son específicamente complementarias a la totalidad o parte del pre ARNm o ARNm por rop (por ejemplo, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133); y construcciones de ADN recombinante para su uso en lograr la transformación estable de objetivos huéspedes particulares, en donde un huésped destino transformado comprende una o más de las moléculas anteriores de ácido nucleico.

B. Moléculas de Ácido Nucleico

La presente invención proporciona, entre otras cosas, moléculas de ARNi (ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi y ARNhp) que inhiben la expresión del gen objetivo en una célula, tejido u órgano de una plaga de coleópteros y/o hemípteros; y las moléculas de ADN capaces de ser expresadas como molécula

de ARNi en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen objetivo en una célula, tejido u órgano de una plaga de coleópteros y/o hemípteros.

Algunas modalidades de la invención proporcionan una molécula de ácido nucleico aislada compuesta por al menos una (por ejemplo, una, dos, tres o más) secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que comprende: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133; el complemento de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133; el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133; una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende SEQ ID NO: 1; una secuencia codificante nativa de un organismo de hemíptero que comprende SEQ ID NO: 115; una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende SEQ ID NO: 1; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de hemíptero que

comprende SEQ ID NO: 115; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133; una secuencia no codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 1; una secuencia no codificante nativa de un organismo de hemíptero que se transcribe en una molécula de ARN Nativo que comprende SEQ ID NO:115; una secuencia no codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe en una molécula de ARN nativo que comprende SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133; el complemento de una secuencia no codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe en una molécula de ARN nativo que comprende SEQ ID NO: 1; el complemento de una secuencia no codificante nativa de un organismo de hemípteros que se transcribe en una molécula de ARN nativo que comprende SEQ ID NO: 115; el complemento de una secuencia no codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe en una molécula de ARN nativo que comprende SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131 o SEQ ID NO: 133; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende SEQ ID NO: 1; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de hemíptero que comprende SEQ ID NO: 115; un

fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131 o SEQ ID NO; 133; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende SEQ ID NO: 1; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de hemíptero que comprende SEQ UD BI: 115; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que comprende SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131 o SEQ ID NO: 133; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 1; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo de hemíptero que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115; un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131 o SEQ ID NO: 133; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante nativa

de un organismo de *Diabrotica* que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 1; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo de de hemíptero que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo de *Meligethes* que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131 o SEQ ID NO: 133. En modalidades particulares, el contacto con o la absorción por una plaga de de coleópteros y/o hemípteros de la secuencia de ácido nucleico aislada inhibe el crecimiento, desarrollo, reproducción y alimentación de la plaga de coleópteros y/o hemípteros.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender al menos una (por ejemplo, una, dos, tres o más) secuencia de ADN capaz de ser expresada como molécula de ARNi en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen objetivo en una célula, tejido u órgano de una plaga de coleópteros y/o hemípteros. Esta(s) secuencia(s) de ADN pueden estar operativamente vinculadas a una secuencia de promotor que funciona en una célula de la molécula de ADN para iniciar o aumentar la transcripción del ARN codificado capaz de formar una(s) molécula(s) de ARNds. En una modalidad, la al menos

una (por ejemplo, uns, dos, tres o más) secuencia de ADN puede derivarse de una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133. Los derivados de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133 incluyen fragmentos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133. En algunas modalidades, tal fragmento puede comprender, por ejemplo, por lo menos unos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133, o un complemento de los mismos. Por lo tanto, tal fragmento de puede comprender, por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o más nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133, o un complemento de los mismos. En estas y otras modalidades, tal fragmento puede comprender, por ejemplo, más de aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133, o un complemento de los mismos. Por lo tanto, un fragmento de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133 puede comprender,

por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, aproximadamente 25,(por ejemplo, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, y 29), aproximadamente 30, aproximadamente 40, (por ejemplo, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44,y 45), aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150, aproximadamente 160, aproximadamente 170, aproximadamente 180, aproximadamente 190, aproximadamente 200 o más nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133, o un complemento de los mismos.

Algunas modalidades comprenden la introducción de moléculas de ARNds parcial o totalmente estabilizadas en una plaga de coleópteros y/o hemípteros para inhibir la expresión de un gen objetivo en una célula, tejido u órgano de la plaga de coleópteros y/o hemípteros. Cuando se expresan como una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi y ARNhp) y son ingeridos por una plaga de coleópteros y/o hemípteros, las secuencias de ácido nucleico formadas por uno o más fragmentos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133 pueden causar uno o más entre la muerte, inhibición del crecimiento, cambio en la proporción de sexos, la reducción en el tamaño de la nidada, cese de infección o cese de la alimentación por una plaga de

coleópteros y/o hemípteros. Por ejemplo, en algunas modalidades, se proporciona una molécula de ARNds que comprende una secuencia de nucleótidos, incluyendo alrededor de 15 a aproximadamente 300 o 19 a aproximadamente 25 nucleótidos que son sustancialmente homólogos a una secuencia del gen objetivo de una plaga de coleópteros y/o hemípteros y que comprende uno o más fragmentos de una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133. La expresión de una molécula tal de ARNds por ejemplo, puede conducir a la inhibición de mortalidad y/o crecimiento en una plaga de coleópteros y/o hemípteros que ingiere la molécula de ARNds.

En ciertas modalidades, las moléculas de ARNds proporcionadas por la invención constituyen las secuencias de nucleótidos complementarias a un gen objetivo compuesto por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133 y/o secuencias de nucleótidos complementarias de un fragmento de EQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133, cuya inhibición del gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros resulta en la reducción o eliminación de un agente de secuencia de nucleótidos o proteína que es esencial para el crecimiento, desarrollo u otra función biológica de la plaga de coleópteros y/o hemípteros. Una secuencia de nucleótidos seleccionada puede mostrar de aproximadamente 80%

al 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133, un fragmento contiguo de la secuencia de nucleótido establecida en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133, o el complemento de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos seleccionada puede mostrar aproximadamente 81%; aproximadamente 82%; aproximadamente 83%; aproximadamente 84%; aproximadamente 85%; aproximadamente 86%; aproximadamente 87%; aproximadamente 88%; aproximadamente 89%; aproximadamente 90%; aproximadamente 91%; aproximadamente 92%; aproximadamente 93%; aproximadamente 94% aproximadamente 95%; aproximadamente 96%; aproximadamente 97%; aproximadamente 98%; aproximadamente 98,5%; aproximadamente 99%; aproximadamente 99,5%; o aproximadamente 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133, un fragmento contiguo de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, o SEQ ID NO:133, o el complemento de cualquiera de los anteriores.

En algunas modalidades, una molécula de ADN capaz de ser expresada como una molécula de ARNi en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen objetivo puede abarcar una secuencia de nucleótido única