específicamente complementaria a la totalidad o parte de una secuencia de ácido nucleico nativa que se encuentra en una o más especies de la plaga de coleópteros y/ hemípteros, o la molécula de ADN puede construirse como una quimera de una pluralidad de tales secuencias específicamente complementarias.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico puede abarcar una primera y una segunda secuencia de nucleótidos separada por una "secuencia espaciadora". Una secuencia espaciadora puede ser una región que comprende cualquier secuencia de nucleótidos que facilita la formación de la estructura secundaria entre las secuencias nucleotídicas primera y segunda, en donde se desee. En una modalidad, la secuencia espaciadora es parte de una secuencia codificadora sentido o antisentido para ARNm. La secuencia espaciadora puede abarcar alternativamente cualquier combinación de nucleótidos u homólogos de la misma que sean capaces de ser vinculados covalentemente a una molécula de ácido nucleico.

Por ejemplo, en algunas modalidades, la molécula de ADN puede comprender una secuencia codificadora de nucleótidos para una o más diferentes moléculas de ARN, en donde cada una de las diferentes moléculas de ARN comprende una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos, en donde las secuencias de nucleótidos primera y segunda son complementarias entre sí. Las secuencias de nucleótidos primera y segunda pueden ser

conectadas dentro de una molécula de ARN por una secuencia espaciadora. La secuencia espaciadora puede constituir parte de la primera secuencia de nucleótidos o la segunda secuencia de nucleótidos. La expresión de la molécula de ARN que comprende las secuencias nucleotídicas primera y segunda puede conducir a la formación de una molécula de ARNds de la presente invención, por el emparejamiento básico específico de las primera y segunda secuencias de nucleótidos. La primera secuencia de nucleótidos o la segunda secuencia de nucleótidos puede ser sustancialmente idéntica a una secuencia de ácido nucleico nativa de una plaga de coleópteros y/o hemípteros (por ejemplo, un gen objetivo o secuencia transcrita no codificante), un derivado de la misma, o una secuencia complementaria a la misma.

Las moléculas de ácido nucleico de ARNds conforman hebras dobles de secuencias de ribonucleótido polimerizado y pueden incluir modificaciones a la troncal de azúcar fosfato o a los nucleósidos. Las modificaciones en la estructura del ARN pueden ser adaptadas para permitir la inhibición específica. En una modalidad, las moléculas de ARNds pueden modificarse mediante un proceso enzimático ubicuo que puede generar moléculas de ARNsi. Este proceso enzimático puede utilizar una enzima de ARNse III, tal como DICER en eucariotas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Ver Elbashir et al. (2001) *Nature* 411:494-498; y Hamilton y Baulcombe (1999) *Science* 286(5441):950-952. La enzima DICER o las enzimas de ARNse II funcionalmente equivalentes escinden hebras más

grandes de moléculas de ARNds o ARNhp en pequeños oligonucleótidos (por ejemplo, ARNsi), cada una de las cuales es típicamente de unos 19-25 nucleótidos de longitud. Las moléculas de ARNsi producidas por estas enzimas tienen de 2 a 3 proyecciones de nucleótidos 3', y terminales 5' fosfato y 3' hidroxilo. Las moléculas de ARNsi generadas por las enzimas ARNse III se desarrollan y separan en ARN de una sola hebra en la célula. Las moléculas de ARNsi después hibridan específicamente con las secuencias de ARN transcritas de un gen objetivo y ambas moléculas de ARN son degradadas posteriormente por un mecanismo degradante de ARN celular inherente. Este proceso puede resultar en la degradación o remoción efectiva de la secuencia de ARN codificada por el gen objetivo en el organismo. El resultado es el silenciamiento post transcripcional del gen objetivo. En algunas modalidades, las moléculas de ARNsi producidas por enzimas endógenas de ARNse III de moléculas de ácido nucleico heterólogas pueden mediar eficientemente la regulación a la baja de los genes objetivo de plagas coleópteros y/o hemípteros.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención puede incluir al menos una secuencia de nucleótidos de origen no natural que puede transcribirse en una molécula de ARN de una sola hebra capaz de formar una molécula de ARNds *in vivo* a través de la hibridación intermolecular. Tales secuencias de ARNds típicamente se auto ensamblan y pueden ser proporcionadas en la fuente de

nutrición de una plaga de coleópteros y/o hemípteros para lograr la inhibición post transcripcional de un gen objetivo. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender dos diferentes secuencias de nucleótidos de origen no natural, cada una de las cuales es específicamente complementaria a un gen objetivo distinto en una plaga de coleópteros y/o hemípteros. Cuando una molécula de ácido nucleico se proporciona como una molécula de ARNds a una plaga de coleópteros y/o hemípteros, la molécula de ARNds inhibe la expresión de al menos dos diferentes genes objetivo en la plaga de coleópteros y/o hemípteros.

C. Obtención de Moléculas de Ácido Nucleico

Una variedad de secuencias nativas de plagas de coleópteros y/o hemípteros puede utilizarse como secuencias objetivo para el diseño de moléculas de ácido nucleico de la invención, como las moléculas de ADN y ARNi que codifican ARNi. La selección de secuencias nativas no es, sin embargo, un proceso directo. Solo un pequeño número de secuencias nativas en la plaga de coleópteros y/o hemípteros serán objetivos efectivos. Por ejemplo, no se puede predecir con certeza si una secuencia nativa determinada puede ser efectivamente regulada a la baja por las moléculas de ácido nucleico de la invención, o si la regulación a la baja de una determinada secuencia nativa tendrá un efecto perjudicial sobre el crecimiento, viabilidad, proliferación o

reproducción de la plaga de coleópteros y/o hemípteros. La gran mayoría de secuencias nativas de la plaga de coleópteros y/o hemípteros, como los ESTs aislados de las mismas (por ejemplo, como se indica en la patente estadounidense No. 7,612,194 y la patente estadounidense No. 7,943,819), no tienen un efecto perjudicial sobre el crecimiento, viabilidad, proliferación o reproducción de la plaga de coleópteros y/o hemípteros, tal como la región de WCR, NCR, *Meligethes aeneus, Euschistus heros, Nezara viridula, Piezodorus guildinii, Halyomorpha halys, Acrosternum hilare* y *Euschistus servus.*

Tampoco es previsible cuáles de las secuencias nativas que pueden tener un efecto perjudicial sobre una plaga de coleópteros y/o hemípteros sean capaces de ser utilizadas en las técnicas recombinantes para la expresión de moléculas de ácido nucleico complementarias a tales secuencias nativas en una planta huésped y proporcionar el efecto perjudicial sobre la plaga de coleópteros y/o hemípteros al alimentarse sin causar daño a la planta hospedera.

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico de la invención (por ejemplo, moléculas de ARNds que se proporcionan en la planta hospedadora de una plaga de coleópteros y/o hemípteros) se seleccionan a secuencias objetivo de ADNc que codifican proteínas o partes de proteínas esenciales para la supervivencia de la plaga de coleópteros y/o hemípteros, tales como las secuencias de

aminoácidos que participan en las vías bioquímicas metabólicas o catabólicas, la división celular, la reproducción, el metabolismo energético, la digestión, el reconocimiento de la planta hospedera, y similares. Como se describe en este documento, la ingestión de composiciones de un organismo que contiene uno o más ARNds, al menos un segmento que es específicamente complementario a por lo menos un segmento sustancialmente idéntico de ARN producido en las células del organismo de plaga objetivo, puede resultar en la muerte u otra inhibición del objetivo. Una secuencia de nucleótidos, ya sea de ADN o de ARN, derivada de una plaga de coleópteros y/o hemípteros puede utilizarse para construir las células vegetales resistentes a la infestación de las plagas de coleópteros y/o hemípteros. La planta hospedera de la plaga de coleópteros y/o hemípteros (por ejemplo, *Z. mays* o *G. max*), por ejemplo, puede ser transformada para contener una o más de las secuencias de nucleótidos derivadas de la plaga de coleópteros y/o hemípteros tal como se dispone en el presente documento. La secuencia de nucleótido transformada en el huésped puede codificar uno o más ARNs que se forman en una secuencia de ARNds en las células o fluidos biológicos dentro del huésped transformado, poniendo a disposición el ARNds en caso de que/cuando la plaga de coleópteros y/o hemípteros forme una relación nutricional con el huésped transgénico. Esto puede resultar en la supresión de la expresión de uno o más genes en las células de la plaga de coleópteros y/o hemípteros y en última instancia, la muerte o

la inhibición de su crecimiento o desarrollo.

Así, algunas modalidades se concentran en un gen que está esencialmente involucrado en el crecimiento, desarrollo y reproducción de una plaga de coleópteros y/o hemípteros. Otros genes objetivo para su uso en la presente invención pueden incluir, por ejemplo, aquellos que desempeñan papeles importantes en la viabilidad de las plagas de coleópteros y/o hemípteros, su movimiento, migración, crecimiento, desarrollo, infectividad, establecimiento de sitios de alimentación y reproducción. Un gen objetivo, por lo tanto, puede ser un gen de limpieza o un factor de transcripción. Además, una secuencia nativa de nucleótidos de plagas de coleópteros y/o hemípteros para su uso en la presente invención también puede derivarse de un homólogo (por ejemplo, un ortólogo), de un gen de planta, viral, bacteriano o de insecto, cuya función es conocida por los expertos en la técnica, y cuya secuencia de nucleótidos es específicamente hibridable con el gen objetivo en el genoma de la plaga de coleópteros y/o hemípteros objetivo. Los métodos de identificación de un homólogo de un gen con una secuencia de nucleótidos conocida por su hibridación son conocidos para los expertos en la técnica.

En algunas modalidades, la invención proporciona métodos para la obtención de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos para producir una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi y ARNhp). Dicha modalidad comprende: (a) analizar uno o más

gen(es) objetivo para su expresión, función y fenotipo al realizar la supresión de genes mediada por ARNds en una plaga de coleópteros y/o hemípteros; (b) sondear una biblioteca de ADNc o ADNg con una sonda que comprende todo o una parte de una secuencia de nucleótidos o un homólogo de la misma de una plaga objetivo de coleópteros y/o hemípteros que muestra una alteración (por ejemplo, reducción) en el fenotipo de crecimiento o desarrollo en un análisis de supersión mediado por ARNds; (c) identificar un clon de ADN que específicamente hibrida con la sonda; (d) aislar el clon de ADN identificado en el paso (b); (e) secuenciar el fragmento de ADNc o ADNg que comprende el clon aislado en el paso (d), en donde la molécula de ácido nucleico secuenciada comprende todas o una parte sustancial de la secuencia de ARN o un homólogo de la misma; y (f) sintetizar químicamente todo o una parte sustancial de una secuencia de gen, o un ARNsi, o ARNsh, o ARNmi, o ARNhp, o ARNm, o ARNds.

En otras modalidades, un método para la obtención de un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos para producir una porción substancial de una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi y ARNhp) incluye: (a) sintetizar el primero y el segundo cebador de oligonucleótido específicamente complementario a una porción de una secuencia de nucleótidos nativa de una plaga de coleópteros y/o hemípteros objetivo; y (b) amplificar un inserto de ADNc o ADNg presente en un vector de clonación usando el primero y el segundo cebador de

oligonucleótidos del paso (a), en donde la molécula de ácido nucleico amplificada comprende una porción sustancial de una molécula de ARNsi o ARNmi o ARNsh o ARNhp o ARNm o ARNds.

Los ácidos nucleicos de la invención puede ser aislados, amplificados o producidos por una serie de métodos. Por ejemplo, una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi y ARNhp) puede obtenerse por amplificación por PCR de una secuencia de ácido nucleico objetivo (por ejemplo, un gen objetivo o una secuencia no codificante transcrita objetivo) derivada de una biblioteca de ADNg o ADNc, o partes de la misma. El ADN o el ARN se pueden extraer de un organismo, y las bibliotecas de ácido nucleico pueden prepararse a partir de éstos usando métodos conocidos por las personas normalmente versadas en la técnica. Las bibliotecas de ADNg o de ADNc generadas a partir de un organismo objetivo pueden ser utilizadas para la amplificación por PCR y la secuenciación de genes objetivo. Un producto de PCR confirmado puede usarse como plantilla para la transcripción *in vitro* para generar ARN sentido y antisentido con mínimos promotores. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico pueden ser sintetizadas por cualquiera de una serie de técnicas (ver, por ejemplo, Ozaki et al. (1992) *Nucleic Acids Research*, 20: 5205-5214; y Agrawal et al. (1990) *Nucleic Acids Research*, 18: 5419-5423), incluyendo el uso de un sintetizador de ADN automatizado (por ejemplo, un sintetizador de ADN/ARN *P. E. Biosystems, Inc.* (Foster City, California) modelo 392 ó 394), usando sustancias químicas

estándar, como la química fosforamidita. Véase, por ejemplo, Beaucage et al. (1992) *Tetrahedron*, 48: 2223-2311; Patentes estadounidenses Nos. 4,415,732, 4,458,066, 4,725,677, 4,973,679, y 4,980,460. También se puede emplear químicas alternativas que resultan en grupos de troncales no naturales, como fosfotioato, fosforamidata y similares.

Una molécula de ARN, ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi o ARNhp de la presente invención puede ser producida químicamente o enzimáticamente por un experto en la técnica a través de reacciones manuales o automáticas, o *in vivo* en una célula que comprende una molécula de ácido nucleico formada por una secuencia que codifica la molécula de ARN, ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi, o ARNhp. El ARN también puede ser producido por síntesis orgánica total o parcial y cualquier ribonucleótido modificado puede ser introducido por síntesis orgánica o enzimática *in vitro*. Una molécula de ARN puede ser sintetizada por una ARN polimerasa celular o una ARN polimerasa bacteriófaga (por ejemplo, T3 ARN polimerasa, T7 ARN polimerasa, y SP6 ARN polimerasa). La expresión de constructos útiles para la clonación y expresión de las secuencias de nucleótidos es conocida en la técnica. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5,593,874, 5,693,512, 5,698,425, 5,712,135, 5,789,214, y 5,804,693. Las moléculas de ARN que son sintetizadas químicamente o por síntesis enzimática *in vitro* pueden ser purificadas antes de la introducción en una célula. Por ejemplo, las moléculas de ARN pueden ser purificadas de una mezcla mediante extracción

con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía o una combinación de los mismos. Alternativamente, pueden utilizarse moléculas de ARN que son sintetizadas químicamente o por síntesis enzimática *in vitro* con nada o un mínimo de purificación, por ejemplo, para evitar pérdidas debido al procesamiento de las muestras. Las moléculas de ARN pueden ser secadas para almacenamiento o disueltas en una solución acuosa. La solución puede contener tampones o sales para promover el recocido y/o la estabilización de hebras dobles de moléculas de ARNds.

En ciertas modalidades, una molécula de ARNds puede formarse por una hebra de ARN única auto complementaria o de dos hebras de ARN complementarias. Las moléculas de ARNds se pueden sintetizar *in vivo* o *in vitro*. Una ARN polimerasa endógena de la célula puede mediar la transcripción de las una o dos hebras de ARN *in vivo*, o la ARN polimerasa clonada puede utilizarse para mediar la transcripción *in vivo* o *in vitro*. La inhibición post transcripcional de un gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros puede ser dirigida al huésped por transcripción específica en un órgano, tejido o tipo celular del huésped (por ejemplo, mediante el uso de un promotor específico de tejido); estimulación de una condición ambiental en el huésped (por ejemplo, mediante el uso de un promotor inducible que es sensible a la infección, estrés, temperatura y/o inductores químicos); y/o ingeniería de transcripción en una etapa de desarrollo o edad del huésped (por ejemplo, mediante el uso de un promotor

específico de etapa de desarrollo). Las hebras de ARN que forman una molécula de ARNds, ya sea transcrita *in vitro* o *in vivo*, pueden o no pueden ser poliadeniladas, y pueden o pueden no ser capaces de ser traducidas a un polipéptido por un aparato traslacional de la célula.

D. Vectores Recombinantes y Transformación de la Célula Huésped

En algunas modalidades, la invención también proporciona una molécula de ADN para su introducción en una célula (por ejemplo, una célula bacteriana, una célula de levadura o una célula vegetal), en donde la molécula de ADN se compone de una secuencia de nucleótidos que, sobre la expresión de ARN y la ingestión de una plaga de coleópteros y/o hemípteros, logra la supresión de un gen objetivo en una célula, tejido u órgano de la plaga de coleópteros y/o hemípteros. Por lo tanto, algunas modalidades proporcionan una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico capaz de ser expresada como una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi y ARNhp) en una célula vegetal para inhibir la expresión del gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros. Para iniciar o mejorar la expresión, estas moléculas de ácido nucleico recombinante pueden abarcar una o más secuencias reguladoras, en donde dichas secuencias reguladoras podrían vincularse operativamente con la secuencia de ácidos

nucleicos capaz de expresarse como una ARNi. Los métodos para expresar una molécula de supresión de genes en plantas son conocidos y pueden utilizarse para expresar una secuencia de nucleótidos de la presente invención. Véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT No. WO06/073727; y la publicación de patente estadounidense No. 2006/0200878 A1).

En modalidades específicas, una molécula de ADN recombinante de la invención puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNds. Estas moléculas de ADN recombinantes pueden codificar moléculas de ARNds capaces de inhibir la expresión de genes endógenos objetivo en una célula de plaga de coleópteros y/o hemípteros después de la ingestión. En muchas modalidades, un ARN transcrito puede formar una molécula de ARNds que puede ser proporcionada en una forma estabilizada; por ejemplo, como una estructura de horquilla y tallo y lazo.

En estas y otras modalidades, una hebra de una molécula de ARNds puede ser formada por la transcripción de una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótido que comprende SEQ ID NO: 1; el complemento de SEQ ID NO: 1; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1; el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1; una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende SEQ ID NO: 1; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende SEQ ID NO: 1; 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 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 por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* (por ejemplo, WCR) que comprende SEQ ID NO: 1; el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Diabrotica* que comprende SEQ ID NO: 1; un fragmento de por lo 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; y el complemento de un fragmento de por lo 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.

En otras modalidades, una hebra de una molécula de ARNds puede ser formada por la transcripción de una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótido que comprende SEQ ID NO: 115; el complemento de SEQ ID NO: 115; un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 115; el complemento de un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 115; una secuencia codificante nativa de un organismo de hemiptérano que comprende SEQ ID NO: 115; el complemento de

una secuencia codificante nativa de un organismo de hemiptérano que comprende SEQ ID NO: 115; una secuencia no codificante nativa de un organismo de hemiptérano que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115; el complemento de una secuencia no codificante nativa de un organismo de hemiptérano que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115; un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de hemiptérano que comprende SEQ ID NO: 115; el complemento de un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de hemiptérano que comprende SEQ ID NO: 115; un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo de hemiptérano que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115; y el complemento de un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo de hemiptérano que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115.

En estas y otras modalidades, una hebra de una molécula de ARNds puede ser formada por la transcripción de una secuencia de nucleótidos que es substancialmente homóloga a una secuencia de nucleótido que consiste de SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:131, orSEQ ID NO:133; el complemento de 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: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: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 *Meligethes* (por ejemplo, PB) que comprende EQ 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 *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 *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 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; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de *Meligethes* (por ejemplo, PB) 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 por lo 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 por lo 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; y el complemento de un fragmento de por lo 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, una molécula de ADN recombinante que codifica una molécula de ARNds puede comprender al menos dos segmentos de secuencia de nucleótidos dentro de una secuencia transcrita, tales secuencias dispuestas de tal manera que la secuencia transcrita comprende un primer segmento de secuencia de nucleótidos en una orientación de sentido, y un segundo segmento de secuencia de nucleótido (compuesto por el complemento del primer segmento de secuencia de nucleótidos) en una orientación antisentido, en relación con al menos un promotor, en donde el segmento de secuencia de nucleótidos de sentido y el segmento de secuencia de nucleótidos antisentido están vinculados o conectados por un segmento de la secuencia espaciadora de aproximadamente cinco (~5) a aproximadamente mil nucleótidos (~1000). El segmento de secuencia espaciadora puede formar un lazo entre los segmentos de secuencia sentido

y antisentido. El segmento de secuencia de nucleótidos de sentido o el segmento de secuencia de nucleótidos antisentido puede ser sustancialmente homólogo a la secuencia de nucleótidos de un gen objetivo (por ejemplo, un gen 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) o un fragmento del mismo. Sin embargo, en algunas modalidades, una molécula de ADN recombinante puede codificar una molécula de ARNds sin una secuencia espaciadora. En modalidades, una secuencia codificante de sentido y una secuencia codificante antisentido pueden tener diferentes longitudes.

Las secuencias identificadas como que tienen un efecto perjudicial sobre las plagas de coleópteros y/o hemípteros o un efecto protector de la planta respecto a las plagas de coleópteros y/o hemípteros pueden ser fácilmente incorporadas en las moléculas de ARNds expresadas a través de la creación de cintas de expresión adecuada en una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención. Por ejemplo, tales secuencias pueden ser expresadas como una horquilla con estructura de tallo y lazo tomando un primer segmento correspondiente a una secuencia del gen objetivo (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 fragmentos de las mismas); vincular esta secuencia a una región espaciadora de segundo segmento que no es homóloga o complementaria al primer segmento; y vincularla a un tercer

segmento, en donde al menos una parte del tercer segmento es sustancialmente complementaria del primer segmento. Tal constructo forma una estructura de tallo y lazo por emparejamiento de la base intramolecular del primer segmento con el tercer segmento, en donde la estructura de tallo forma y comprende el segundo segmento. Ver, por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidenses Nos. 2002/0048814 y 2003/0018993; y las publicaciones internacionales PCT WO94/01550 y WO98/05770. Se puede generar una molécula de ARNds, por ejemplo, en forma de una estructura de doble hebra tal como una estructura de lazo y tallo (por ejemplo, horquilla), en donde la producción de los ARNsi dirigidos a una secuencia nativa de plaga de coleópteros y/o hemípteros es potenciada por la co-expresión de un fragmento del gen objetivo, por ejemplo en una cinta expresable de planta adicional, que conduce a la producción mejorada de ARNsi, o reduce la metilación para evitar el silenciamiento génico transcripcional del promotor horquilla de ARNds.

Modalidades de la invención incluyen la introducción de una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención presente en una planta (es decir, transformación) para alcanzar niveles inhibitorios de plagas de coleópteros y/o hemípteros de la expresión de una o más moléculas de ARNi. Una molécula de ADN recombinante puede, por ejemplo, ser un vector, tal como un plásmido lineal o un plásmido circular cerrado. El sistema de vector puede ser un vector plásmido único, o dos o más vectores o plásmidos que

contienen juntos el ADN total a ser introducido en el genoma de un huésped. Además, un vector puede ser un vector de expresión. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden insertarse adecuadamente en un vector bajo el control de un promotor adecuado que funciona en uno o más huéspedes para activar la expresión de una secuencia codificante vinculada u otra secuencia de ADN. Muchos vectores están disponibles para este propósito, y la selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos a insertarse en el vector y la célula huésped especial a ser transformada con el vector. Cada vector contiene varios componentes según su función (por ejemplo, la amplificación del ADN o expresión del ADN) y la célula huésped especial con la cual es compatible.

Para impartir resistencia a las plagas de coleópteros y/o hemípteros a una planta transgénica, un ADN recombinante por ejemplo, puede ser transcrito en una molécula de ARNi (por ejemplo, una molécula de ARN que forma una molécula de ARNds) dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante. Una molécula de ARNi puede componerse de una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente homóloga y específicamente hibridable a la secuencia de nucleótido transcrita correspondiente dentro de una plaga de coleópteros y/o hemípteros que puede causar daños a las especies de plantas huésped. La plaga de coleópteros y/o hemípteros puede contactar la molécula de ARNi que se transcribe en las células de la planta huésped transgénica, por ejemplo, por la

ingestión de células o fluidos de la planta huésped transgénica que comprenden la molécula de ARNi. Por lo tanto, la expresión de un gen objetivo es suprimida por la molécula de ARNi en plagas de coleópteros y/o hemípteros que infestan la planta huésped transgénica. En algunas modalidades, supresión de la expresión del gen objetivo en la plaga de coleópteros y/o hemípteros objetivo puede resultar en que la planta sea resistente al ataque de la plaga.

Para habilitar la administración de las moléculas de ARNi a una plaga de coleópteros y/o hemípteros en una relación nutricional con una célula vegetal que ha sido transformada con una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención, se requiere la expresión (es decir, transcripción) de las moléculas de ARNi en la célula vegetal. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico recombinante puede componerse de una secuencia de nucleótidos de la invención operativamente vinculada a una o más secuencias reguladoras, tales como una secuencia de promotor heterólogo que funciona en una célula huésped, como una célula bacteriana en la que la molécula de ácido nucleico es amplificada y una célula vegetal en la cual la molécula de ácido nucleico va a expresarse.

Los promotores adecuados para su uso en moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen aquellas que son inducibles, virales, sintéticas, o constitutivas, todas las cuales son muy conocidas en la técnica. Ejemplos no limitantes que describen tales promotores incluyen las

patentes estadounidenses Nos. 6,437,217 (promotor de maíz RS81); 5,641,876 (promotor de actina del arroz); 6,426,446 (promotor de maíz RS324); 6,429,362 (promotor de maíz PR 1); 6,232,526 (promotor de maíz A3); 6,177,611 (promotores de maíz constitutivos); 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196 (promotor CaMV 35S); 6,433,252 (promotor de maíz L3 oleosina); 6,429,357 (promotor de actina del arroz 2, y actina del arroz 2 intrón); 6,294,714 (promotores inducibles de luz); 6,140,078 (promotores inducibles de sal); 6,252,138 (promotores inducibles de patógeno); 6,175,060 (promotores inducibles de deficiencia de fósforo); 6,388,170 (promotores bidireccionales); 6,635,806 (promotor de gamma coixina); y la publicación de patente estdounidense No. 2009/757,089 (promotor de aldolasa de cloroplasto del maíz). Los promotores adicionales incluyen el promotor de nopalina sintasa (NOS) (Ebert et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* E.U.A. 84(16): 5745-5749) y los promotores de octopina sintasa (OCS) (que se realizan en plásmidos inductores de tumor de *Agrobacterium tumefaciens*); los promotores de *caulimovirus* como el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 19S (Lawton et al. (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:315-324); el promotor 35S CaMV (Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812; el promotor del virus de mosaico de escrofularia 35S (Walker et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* E.U.A. 84 (19):6624-6628); el promotor de sacarosa sintasa (Yang y Russell (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* E.U.A. 87:4144-4148); el promotor del complejo del gen R (Chandler et al. (1989)

Plant Cell 1:1175 1183); el promotor del gen de proteína de unión a clorofila a/b; CaMV 35S (patentes estadounidenses Nos. 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196); FMV 35S (Patentes estadounidenses Nos. 5,378,619 y 6,051,753); un promotor de PC1SV (Patente estadounidense No. 5,850,019); el promotor de SCP1 (Patente estadounidense No. 6,677,503); y los promotores de AGRtu.nos (No. de Acceso GENBANK® V00087; Depicker et al. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1:561-573; Bevan et al. (1983) *Nature* 304:184 187).

En modalidades particulares, las moléculas de ácido nucleico de la invención constituyen un promotor específico del tejido, como un promotor específico de raíz. Los promotores específicos de raíz conducen la expresión de secuencias codificadoras operativamente vinculadas exclusiva o preferentemente en el tejido radical. Se conocen ejemplos de promotores específicos de raíz en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5,110,732; 5,459,252 y 5,837,848; y Opperman et al. (1994) *Science* 263:221-3; y Hirel et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 20:207-18. En algunas modalidades, una secuencia de nucleótidos o fragmento de control de plagas de coleópteros y/o hemípteros según la invención puede ser clonada entre dos promotores específicos de raíz orientados en direcciones opuestas transcripcionales en relación con la secuencia de nucleótidos o fragmento, y que son operables en una célula vegetal transgénica y expresadas en la misma para producir moléculas de ARN en la célula vegetal transgénica que posteriormente

puede formar moléculas de ARNds, como se describe, *supra*. Las moléculas de ARNi expresadas en los tejidos vegetales pueden ser ingeridas por una plaga de coleópteros y/o hemípteros para lograr la supresión de la expresión del gen objetivo.

Las secuencias reguladoras adicionales que opcionalmente pueden estar operativamente vinculadas a una molécula de ácido nucleico de interés incluyen 5'UTRs que funcionan como una secuencia de traducción líder situada entre una secuencia de promotor y una secuencia codificante. La secuencia de traducción líder está presente en el ARNm completamente procesado, y puede afectar el proceso de la transcripción primaria y/o estabilidad del ARN. Ejemplos de secuencias de traducción líder incluyen líderes de proteína de golpe de calor de maíz y petunia (patente estadounidense No. 5,362,865), líderes de proteína de recubrimiento de virus de planta, líderes de rubisco de planta y otros. Ver, por ejemplo, Turner y Foster (1995) *Molecular Biotech.* 3(3):225-36. Ejemplos no limitantes de 5'UTRs incluyen GmHsp (Patente estadounidense No. 5,659,122); PhDnaK (Patente estadounidense No. 5,362,865); AtAnt1; TEV (Carrington y Freed (1990) *J. Virol.* 64:1590-7); y AGRtunos (No. de acceso a GENBANK® V00087; y Bevan et al. (1983) *Nature* 304:184-7).

Otras secuencias reguladoras que opcionalmente pueden estar operativamente vinculadas a una molécula de ácido nucleico de interés también incluyen secuencias de 3' no traducidas, regiones de terminación de la transcripción 3' o regiones de poli adenilación. Estos son elementos genéticos

situados hacia abajo de una secuencia de nucleótidos e incluyen polinucleótidos que proporcionan señal de poliadenilación y/u otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción o el proceso de ARNm. La señal de poliadenilación en plantas funciona para causar la adición de nucleótidos de poliadenilato al extremo 3' del precursor del ARNm. La secuencia de poliadenilación puede ser derivada de una variedad de genes de planta o de los genes del ADN-T. Un ejemplo de una región de terminación de transcripción 3' no limitante es la región 3' de nopalina sintasa (nos 3'; Fraley et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* E.U.A. 80:4803-7). Un ejemplo del uso de diferentes 3' regiones no traducidas se proporciona en Ingelbrecht et al., (1989) *Plant Cell* 1:671-80. Ejemplos no limitativos de señales de poliadenilación incluyen uno del gen *Pisum sativum* RbcS2 (Ps. RbcS2 E9; Coruzzi et al. (1984)EMBO J. 3:1671 9) y AGRtu.nos (No. de Acceso a GENBANK® E01312).

Algunas modalidades pueden incluir un vector de transformación de planta que consta de una molécula de ADN aislada y purificada que comprende al menos una de las secuencias reguladoras descritas arriba operativamente vinculadas a una o más secuencias de nucleótidos de la presente invención. Cuando se expresan, las una o más secuencias de nucleótidos resultan en una o más molécula(s) de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos específicamente complementaria a la totalidad o parte de una molécula de ARN nativa en una plaga de coleópteros y/o

hemípteros. Por lo tanto, las secuencias de nucleótidos pueden comprender un segmento de codificación de todo o parte de una secuencia de ribonucleótido presente dentro de una transcripción objetivo del ARN de plagas de coleópteros y/o hemípteros y pueden comprender repeticiones invertidas de todo o parte de una transcripción objetivo de plagas coleópteros y/o hemípteros. Un vector de transformación de plantas puede contener secuencias específicamente complementarias a más de una secuencia objetivo, permitiendo la producción de más ARNds para inhibir la expresión de dos o más genes en células de una o más poblaciones o especies de plagas de coleópteros y/o hemípteros objetivo. Los segmentos de la secuencia de nucleótidos específicamente complementaria a las secuencias de nucleótidos presentes en diferentes genes pueden combinarse en una molécula única de ácido nucleico compuesta para su expresión en una planta transgénica. Estos segmentos pueden ser contiguos o separados por una secuencia espaciadora.

En algunas modalidades, un plásmido de la invención presente que ya contiene al menos una secuencia de nucleótidos de la invención puede ser modificada por la inserción secuencial de nucleótidos adicionales en el mismo plásmido, en donde las secuencias de nucleótidos adicionales están operativamente vinculadas con los mismos elementos reguladores que la al menos una secuencia de nucleótidos original. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico se puede diseñar para la inhibición de múltiples

genes objetivo. En algunas modalidades, los múltiples genes a ser inhibidos pueden obtenerse de la misma especie de plaga de coleópteros y/o hemípteros, que puede aumentar la eficacia de la molécula de ácido nucleico. En otras modalidades, los genes pueden derivarse de diversas plagas de coleópteros y/o hemípteros, que pueden ampliar la gama de plagas de coleópteros y/o hemípteros contra las que el agente(s) es/son eficaz(ces). Cuando hay múltiples genes objetivo para la supresión o una combinación de expresión y supresión, puede fabricarse un elemento de ADN policistrónico.

Una molécula de ácido nucleico recombinante o vector de la presente invención puede comprender un marcador seleccionable que confiere un fenotipo seleccionable en una célula transformada, tal como una célula vegetal. Los marcadores seleccionables pueden usarse también para seleccionar las plantas o las células vegetales que forman una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención. El marcador puede codificar resistencia biocida, antibiótica (por ejemplo, kanamicina, Geneticina (G418), bleomicina, Higromicina, etc.), o resistencia a los herbicidas (por ejemplo, el glifosato, etc.). Ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a: un neo gen que codifica para la resistencia a la kanamicina y puede ser seleccionado para el uso de kanamicina, G418, etc..; un gen de barra que codifica para la resistencia a bialafos; un gen de EPSP sintasa mutado que codifica la resistencia al glifosato; un gen de nitrilasa que confiere resistencia a

bromoxinila; un gen mutante de acetolactato sintasa (ALS) que confiere resistencia a imidazolinonas o sulfonilurea; y un gen DHFR resistente al metotrexato. Existen múltiples marcadores seleccionables que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloramfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina, espectinomicina, rifampicina, estreptomicina y tetraciclina y similares. Ejemplos de tales marcadores seleccionables se ilustran en, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5,550,318; 5,633,435; 5,780,708 y 6,118,047.

Una molécula de ácido nucleico recombinante o vector de la presente invención también puede incluir un marcador tamizable. Los marcadores tamizables pueden usarse para supervisar la expresión. Los marcadores tamizables ejemplares incluyen un gen de β-glucuronidasa o *uidA* (GUS) que codifica una enzima para la que varios sustratos cromogénicos son conocidos (Jefferson et al. (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405); un gen locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en los tejidos de plantas (Dellaporta et al. (1988) "*Molecular cloning of the maize R nj allele by transposon tagging with Ac.*" En el *18th Stadler Genetics Symposium,* P. Gustafson y R. Appels, eds. (New York: Plenum), pp. 263 82); *a β-lactamase gen* (Sutcliffe et al. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.* E.U.A. 75:3737-41); un gen que codifica una enzima para la que se conocen varios sustratos cromogénicos

(p. Ej., PADAC, una cefalosporina cromógena); un gen de luciferasa (Ow et al. (1986) *Science* 234:856-9); un gen de xylE que codifica una dioxigenasa de catecol que puede convertir catecoles cromogénicos (Zukowski et al. (1983) *Gene* 46(2 3):247-55); un gen de amilasa (Ikatu et al. (1990) *Bio/Technol.* 8:241-2); un gen de tirosinasa que codifica una enzima capaz de oxidar tirosina a DOPA y dopaquinona, que a su vez se condensa a melanina (Katz et al. (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-14); y una α-galactosidasa.

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico recombinante, como se describe, *supra*, pueden utilizarse en los métodos para la creación de plantas transgénicas y expresión de los ácidos nucleicos heterólogos en plantas para preparar las plantas transgénicas que muestran menor susceptibilidad a plagas de coleópteros y/o hemípteros. Los vectores de transformación de planta pueden ser preparados, por ejemplo, insertando moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de ARNi en vectores de transformación de plantas y la introducción de estos en las plantas.

Los métodos adecuados para la transformación de las células huésped incluyen cualquier método por el cual el ADN puede introducirse en una célula, como por la transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5,508,184), por ingesta de ADN mediada por desecación/inhibición (ver, por ejemplo, Potrykus et al. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:183-8), por electroporación (ver,

por ejemplo, patente estadounidense No. 5,384,253), por agitación con fibras de carburo de silicio (ver, por ejemplo, patentes estadounidenses Nos. 5,563,055; 5,591,616; 5,693,512; 5,824,877; 5,981,840; y 6,384,301) y por aceleración de partículas recubiertas de ADN (ver, por ejemplo, patentes estadounidenses Nos. 5,015,580, 5,550,318, 5,538,880, 6,160,208, 6,399,861 y 6,403,865), etc. Las técnicas que son particularmente útiles para transformar el maíz se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses Nos. 5,591,616, 7,060,876 y 7,939,3281. A través de la aplicación de técnicas como estas, las células de prácticamente cualquier especie pueden transformarse establemente. En algunas modalidades, la transformación de ADN se integra en el genoma de la célula huésped. En el caso de especies multicelulares, las células transgénicas pueden ser regeneradas en un organismo transgénico. Cualquiera de estas técnicas puede utilizarse para producir una planta transgénica, por ejemplo, comprendiendo una o más secuencias de ácido nucleico de codificación de una o más moléculas de ARNi en el genoma de la planta transgénica.

El método más ampliamente utilizado para introducir un vector de expresión en las plantas se basa en el sistema de transformación natural de varias especies de *Agrobacterium*. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias patógenos del suelo de la planta que transforman genéticamente las células vegetales. Los plásmidos de Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, llevan

los genes responsables de la transformación genética de la planta. Los plásmidos de Ti (inductores de tumor) contienen un segmento grande, conocido como ADN-T, que se transfiere a las plantas transformadas. Otro segmento del plásmido de Ti, la región de Vir, es responsable de la transferencia de ADN-T. La región de ADN-T está bordeada por repeticiones terminales. En vectores binarios modificados, los genes inductores de tumores han sido eliminados y las funciones de la región de Vir se utilizan para transferir ADN extraño bordeado por las secuencias de borde de ADN-T. La región T también puede contener un marcador seleccionable para la recuperación eficiente de células y plantas transgénicas y un sitio de clonación múltiple para la inserción de secuencias para la transferencia tal como un ácido nucleico de codificación de ARNds.

Así, en algunas modalidades, un vector de transformación de plantas se deriva de un plásmido de Ti de *A. tumefaciens* (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 4,536,475, 4,693,977, 4,886,937, y 5,501,967; y la patente europea No. EP 0 122 791) o un plásmido Ri de *A. rhizogenes*. Los vectores de transformación de planta adicionales incluyen, por ejemplo y sin limitación, las descritas por Herrera Estrella et al. (1983) *Nature* 303:209-13; Bevan et al. (1983) *Nature* 304:184-7; Klee et al. (1985) *Bio/Technol.* 3:637-42; y la patente europea No. EP 0 120 516 y aquellos derivados de cualquiera de los anteriores. Otras bacterias como *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium*

que interactúan naturalmente con las plantas pueden modificarse para mediar la transferencia de genes a un número de diversas plantas. Estas bacterias simbióticas asociadas a las plantas asociadas pueden hacerse competentes en materia de transferencia de genes por la adquisición de un plásmido de Ti desarmado y un vector binario adecuado.

Después de efectuar el suministro de ADN exógeno a células receptoras, las células transformadas se identifican generalmente por un mayor cultivo y regeneración de la planta. Con el fin de mejorar la capacidad de identificar las células transformadas, uno puede desear emplear un gen marcador seleccionable o tamizable, como se estableció previamente, con el vector de transformación utilizado para generar el transformante. En el caso donde se utiliza un marcador seleccionable, las células transformadas se identifican dentro de la población de células transformadas potencialmente al exponer las células a un agente o agentes selectivo(s). En el caso donde se utiliza un marcador tamizable, las células pueden ser tamizadas para el rasgo de gen marcador deseado.

Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o las células que han sido calificadas positivas en un análisis de proyección, pueden cultivarse en medios que soportan la regeneración de plantas. En algunas modalidades, cualquier medio de cultivo de tejidos de planta adecuado (por ejemplo, los medios MS y N6) puede ser modificado mediante la inclusión de otras sustancias, tales

como reguladores de crecimiento. El tejido puede ser mantenido en un medio básico con reguladores de crecimiento hasta que suficiente tejido está disponible para iniciar los esfuerzos de regeneración de plantas, o después de rondas repetidas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración (por ejemplo, típicamente cerca de 2 semanas), entonces se transfiere a medios conducentes para brotar la formación. Los cultivos son transferidos periódicamente hasta que se ha producido suficiente brote de formación. Una vez que se forman brotes, se transfieren a medios conducentes para la formación de la raíz. Una vez que se forman suficientes raíces, las plantas pueden transferirse a la tierra para su crecimiento y maduración.

Para confirmar la presencia de una molécula de ácido nucleico de interés (por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica una o más moléculas de ARNi que muestran la expresión del gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros) en las plantas de regeneración, se puede realizar una gran variedad de ensayos. Estos ensayos incluyen, por ejemplo: ensayos biológicos moleculares, tales como southern y western blot, PCR y secuenciación de ácido nucleico; ensayos bioquímicos, tales como detectar la presencia de un producto de la proteína, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y/o inmuno blots) o por la función enzimática; ensayos de parte de planta, tales como ensayos de hoja o raíz; y análisis del fenotipo de la planta regenerada

completa.

Los eventos de integración pueden ser analizados, por ejemplo, por amplificación por PCR usando, por ejemplo, los cebadores del oligonucleótido específico para una molécula de ácido nucleico de interés. El genotipado de PCR se entiende que incluye, pero no se limita a, reacción de cadena de polimerasa (PCR) de la amplificación del ADN genómico derivado de tejido de callo de planta huésped aislada que se espera que contenga una molécula de ácido nucleico de interés integrada en el genoma, seguido de análisis estándar de clonación y análisis de secuencia de los productos de amplificación de PCR. Los métodos de genotipado de PCR se han descrito bien (por ejemplo, Rios, G. et al. (2002) *Plant J.* 32:243 53) y pueden aplicarse al ADN genómico derivado de cualquier especie de plantas (por ejemplo, *Z. mays* o *G. max*) o tipo de tejido, incluyendo cultivos celulares.

Una planta transgénica formada usando métodos de transformación dependiente de *Agrobacterium* contiene típicamente solo una secuencia de ADN recombinante insertada en un cromosoma. La única secuencia de ADN recombinante se conoce como un "evento transgénico" o "evento de integración". Tales plantas transgénicas son hemicigóticas para la secuencia exógena insertada. En algunas modalidades, una planta transgénica homocigótica con respecto a un transgen puede obtenerse por el apareamiento sexual (autofecundación) de una planta transgénica segregante

independiente que contiene una secuencia de genes exógenos para sí misma, por ejemplo una planta T_0, para producir semilla T_1. Una cuarta parte de la semilla T_1 producida será homocigótica con respecto al transgén. El germinado de la semilla T1 resulta en plantas que pueden ser probadas para heterocigoto, típicamente mediante un ensayo SNP o un ensayo de amplificación térmica que permite la distinción entre heterocigotos y homocigotos (es decir, un ensayo de cigosidad).

En modalidades particulares, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más moléculas diferentes de ARNi que tienen un efecto inhibitorio en la plaga de coleópteros y/o hemípteros se producen en una célula vegetal. Las moléculas de ARNi (por ejemplo, las moléculas de ARNds) pueden expresarse de múltiples secuencias de ácido nucleico introducidas en diferentes eventos de transformación, o de una sola secuencia de ácido nucleico introducida en un solo evento de transformación. En algunas modalidades, una pluralidad de moléculas de ARNi son expresadas bajo el control de un promotor individual. En otras modalidades, una pluralidad de moléculas de ARNi son expresadas bajo el control de múltiples promotores. Pueden expresarse moléculas únicas de ARNi que comprenden múltiples secuencias de ácido nucleico que son cada una homólogas a diferentes locus dentro de una o más plagas de coleópteros y/o hemípteros (por ejemplo, el locus definido 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), ambos en diferentes poblaciones de la misma especie de plaga de coleópteros y/o hemípteros, o en diferentes especies de plagas de coleópteros y/o hemípteros.

Además de la transformación directa de una planta con una molécula de ácido nucleico recombinante, las plantas transgénicas pueden ser preparadas cruzando una primera planta teniendo al menos un evento transgénico con una segunda planta que carecer de tal evento. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARNi puede introducirse en una primera línea de la planta que es susceptible de transformación para producir una planta transgénica, dicha planta transgénica puede ser cruzada con una segunda línea de planta para la introgresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de ARNi en la segunda línea de la planta.

La invención también incluye productos que contengan una o más de las secuencias de la presente invención. Modalidades particulares incluyen productos básicos producidos a partir de una planta o semilla recombinante que contiene una o más de las secuencias de nucleótidos de la presente invención. Un producto básico que contiene una o más de las secuencias de la presente invención pretende incluir, pero no se limita a, comidas, aceites, granos enteros o triturados o semillas de una planta, o cualquier alimento o producto compuesto por harina, aceite o

grano triturado o entero de una planta o semilla recombinante que contiene uno o más de las secuencias de la presente invención. La detección de una o más de las secuencias de la presente invención en una o más materias primas o productos básicos contemplados en el presente es de hecho evidencia de que la materia prima o producto básico de las materias primas se produce de una planta transgénica diseñada para expresar una o más de las secuencias de nucleótidos de la presente invención a efectos de controlar las plagas de plantas de coleópteros y/o hemípteros usando métodos de supresión genética mediada pro ARNds.

En algunos aspectos, las semillas y productos básicos producidos por las plantas transgénicas derivadas de las células vegetales transformadas están incluidos, en donde las semillas o productos básicos comprenden una cantidad detectable de una secuencia de ácido nucleico de la invención. En algunas modalidades, dichos productos básicos pueden ser producidos, por ejemplo, por la obtención de plantas transgénicas y preparando alimentos para o alimentándolas de los mismos. Los productos básicos que comprenden una o más de las secuencias de ácido nucleico de la invención incluyen, por ejemplo y sin limitación: comidas, aceites, granos enteros o triturados o semillas de una planta y cualquier producto alimenticio que comprenda cualquier comida, aceite o grano triturado o entero de una planta o semilla recombinante compuesta por una o más de las secuencias de ácido nucleico de la invención. La detección de

una o más de las secuencias de la invención en una o más materias primas o productos básicos es de hecho evidencia de que la materia prima o producto básico se produce de una planta transgénica diseñada para expresar una o más de las moléculas de ARNi de la invención a efectos de controlar las plagas de plantas de coleópteros y/o hemípteros.

En algunas modalidades, una planta o semilla transgénica compuesta por una molécula de ácido nucleico de la invención también puede comprender por lo menos uno u otro evento transgénico en su genoma, incluyendo, sin limitación: un evento transgénico del que se transcribe una molécula de ARNi dirigida a un lugar en una plaga de coleópteros y/o hemípteros distinto al definido 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, tales como, por ejemplo, uno o más lugares seleccionados del grupo que comprende Caf1 180 (Publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2012/0174258), VatpaseC (Publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2012/0174259), Rho1 (Publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2012/0174260), VatpaseH (Publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2012/0198586), PPI 87B (Publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2013/0091600), RPA70 (Publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2013/0091601) y RPS6 (Publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2013/0097730); un evento transgénico para el que se transcribe una molécula de ARNi dirigida a un gen

en un organismo que no sea una plaga de coleópteros y/o hemípteros (por ejemplo, una nemátodo parásito de planta); un gen que codifica una proteína insecticida (por ejemplo, una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*, tal como, por ejemplo, Cry34Ab1 (Patente estadounidense Nos. 6,127,180, 6,340,593, y 6,624,145), Cry35Ab1 (Patente estadounidense Nos. 6,083,499, 6,340,593, y 6,548,291), una combinación de "Cry34/35Ab1" en un solo evento (p. Ej., evento de maíz DAS 59122-7; patente estadounidense No. 7,323,556), Cry3A (por ejemplo, patente estadounidense No. 7,230,167), Cry3B (por ejemplo, patente estadounidense No. 8,101,826), Cry6A (por ejemplo, patente estadounidense No. 6,831,062) y sus combinaciones (por ejemplo, solicitudes de patente estadounidenses Nos. 2013/0167268, 2013/0167269 y 2013/0180016); un gen de tolerancia a herbicidas (por ejemplo, un gen que proporciona tolerancia al glifosato, glufosinato, dicamba o 2,4 D (por ejemplo, patente estadounidense No. 7,838,733)); y un gen que contribuye a un fenotipo deseable en la planta transgénica, tal como aumento del rendimiento, metabolismo de ácidos grasos alterado o restauración de la androesterilidad citoplasmática). En modalidades particulares, las secuencias de codificación de moléculas de ARNi de la invención pueden combinarse con otro control de insectos o con rasgos de resistencia a la enfermedad en una planta para lograr los rasgos deseados para mejorar el control de daño por insectos y enfermedad de la planta. La combinación de los rasgos de control de insectos

que emplean distintos modos de acción puede proporcionar plantas transgénicas protegidas con durabilidad superior sobre las plantas que albergan un rasgo único de control, por ejemplo, debido a la reducida probabilidad de que la resistencia a los rasgos se desarrolle en el campo.

V. Supresión de Gen Objetivo en una Plaga de Coleópteros y/o Hemípteros

A. Información General

En algunas modalidades de la invención, por lo menos una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de coleópteros y/o hemípteros puede ser proporcionada a una plaga de coleópteros y/o hemípteros, en donde las moléculas de ácido nucleico llevan al silenciamiento de genes mediado por ARNi en la plaga de coleópteros y/o hemípteros. En modalidades particulares, una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi y ARNhp) puede ser proporcionada a la plaga de coleópteros y/o hemípteros. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de coleópteros y/o hemípteros puede ser proporcionada a una plaga de coleópteros y/o hemípteros contactando la molécula de ácido nucleico con la plaga de coleópteros y/o hemípteros. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de coleópteros y/o hemípteros puede ser proporcionada en un

sustrato de alimentación a la plaga de coleópteros y/o hemípteros, por ejemplo, una composición nutricional. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico útil para el control de plagas de coleópteros y/o hemípteros puede proporcionarse a través de la ingestión del material vegetal que comprende la molécula de ácido nucleico que es ingerida por las plagas de coleópteros y/o hemípteros. En ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico está presente en el material vegetal a través de la expresión de una secuencia de ácido nucleico recombinante introducida en el material vegetal, por ejemplo, mediante la transformación de una célula vegetal con un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico recombinante y la regeneración de un material vegetal o de toda la planta a partir de la célula vegetal transformada.

B.Supresión de Gen Objetivo Mediada por ARNi

En las modalidades, la invención proporciona moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNds, ARNsi, ARNsh, ARNmi y ARNhp) que pueden estar diseñadas para las secuencias de nucleótidos nativas esenciales (por ejemplo, genes esenciales) en el transcriptoma de una plaga de coleópteros y/o hemípteros (por ejemplo, WCR, NCR, Meligethes aeneus, Euschistus heros, Nezara viridula, Piezodorus guildinii, Halyomorpha halys, Acrosternum hilare y Euschistus servus), por ejemplo mediante el diseño de una molécula de ARNi que

comprende al menos un cadena formado por una secuencia de nucleótidos complementaria específicamente la secuencia objetivo. La secuencia de la molécula de ARNi diseñada puede ser idéntica a la secuencia objetivo, o puede incorporar los desajustes que no impidan la hibridación específica entre la molécula de ARNi y su secuencia objetivo.

Las moléculas de ARNi de la invención pueden utilizarse en los métodos de supresión del gen en una plaga de coleópteros y/o hemípteros, reduciendo el nivel o la incidencia de daños causados por la plaga en una planta (por ejemplo, una planta transformada protegida que comprende una molécula de ARNi). Como se utiliza en este documento, el término "supresión del gen" se refiere a cualquiera de los métodos conocidos para reducir los niveles de proteína producidos como resultado de la transcripción genética al ARNm y posterior traducción del ARNm, incluyendo la reducción de la expresión de proteína de un gen o una secuencia codificante que incluye inhibición post-transcripcional de la expresión y la represión transcripcional. La inhibición post-transcripcional está mediada por homología específica entre todos o una parte de un ARNm transcrito de un gen destinado a la represión y la correspondiente molécula de ARNi utilizada para suprimir. Además, la inhibición post-transcripcional se refiere a la reducción sustancial y mensurable de la cantidad de ARNm disponibles en la célula para el enlace por ribosomas.

En algunas modalidades donde una molécula de ARNi es una molécula de ARNds, la molécula de ARNds puede ser dividida por la enzima DICER, en moléculas de ARNsi cortas (aproximadamente 20 nucleótidos de largo). La molécula de ARNsi en cadena doble generada por la actividad DICER sobre la molécula de ARNds puede dividirse en dos siRNAs de cadena simple; la "hebra pasajera" y la "hebra guía". La hebra pasajera puede ser degradada y la hebra guía puede ser incorporada en RISC. La inhibición post-transcripcional ocurre por hibridación específica de la concentración guía con una secuencia complementaria específicamente de una molécula de ARNm y la división posterior por la enzima, Argonaute (componente catalítico del complejo RISC).

En otras modalidades de la invención, se puede utilizar cualquier forma de la molécula de ARNi. Los expertos en la técnica entenderán que las moléculas de ARNds típicamente son más estables que las moléculas de ARN en cadena simple, durante la preparación y durante el paso de ofrecer la molécula de ARNi a una célula y suelen ser también más estables en una célula. Así, mientras que las moléculas de ARNsi y ARNmi, por ejemplo, pueden ser igualmente efectivas en algunas modalidades, una molécula de ARNds puede ser elegida debido a su estabilidad.

En modalidade particulares, se proporciona una molécula de ácido nucleico que consta de una secuencia de nucleótidos, secuencia de nucleótidos que puede expresarse in

vitro para producir una molécula de ARNi que es substancialmente homóloga a una molécula de ácido nucleico codificada por una secuencia de nucleótidos en el genoma de una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En ciertas modalidades, la molécula de ARNi transcrita in vitro puede ser una molécula estabilizada de ARNds que consta de una estructura de tallo-bucle. Después que una plaga de coleópteros y/o hemípteros entra en contacto con la molécula de ARNi transcrito in vitro, puede ocurrir la inhibición post-transcripcional de un gen objetivo en la plaga de coleópteros y/o hemípteros (por ejemplo, un gen esencial).

En algunas modalidades de la invención, la expresión de una molécula de ácido nucleico que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos se utiliza en un método para la inhibición post-transcripcional de un gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros, en donde la secuencia de nucleótidos es seleccionada del grupo formado por: SEQ ID NO: 1; el complemento de SEQ ID NO: 1; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1; el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1; una secuencia codificante nativa de un organismo de Diabrotica (por ejemplo, WCR) que comprende SEQ ID NO: 1; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de Diabrotica compuesto por SEQ ID NO: 1; 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 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 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 por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de Diabrotica (por ejemplo, WCR) que comprende SEQ ID NO: 1; el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de Diabrotica compuesto por SEQ ID NO: 1; un fragmento de por lo 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; y el complemento de un fragmento de por lo 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. En ciertas modalidades, la expresión de una molécula de ácido nucleico que es idéntica al menos el 80% (por ejemplo, 80%, 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 99%, aproximadamente 100% y 100%) con cualquiera de los anteriores puede utilizarse. En estas y otras modalidades, puede expresarse una molécula de ácido nucleico que que hibridiza específicamente a una molécula de ARN presente en al menos una célula de una plaga de coleópteros y/o hemípteros.

En ciertas modalidades de la invención, la expresión de una molécula de ácido nucleico que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos se utiliza en un método para la inhibición post-transcripcional de un gen objetivo en una plaga de coleópteros, en donde la secuencia de nucleótidos es seleccionada del grupo formado por: SEQ ID NO: 115; el complemento de SEQ ID NO: 115; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 115; el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 115; una secuencia codificante nativa de un organismo hemípteros SEQ ID NO: 115; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo hemípteros que comprende SEQ ID NO: 115; una secuencia no codificante nativa de un organismo hemípteros que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115; el complemento de una secuencia no codificante nativa de un organismo hemípteros

que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115; el complemento de una secuencia no codificante nativa de un organismo hemípteros que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo hemípteros que comprende SEQ ID NO: 115; el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo hemípteros que comprende SEQ ID NO: 115; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo hemípteros que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115; y el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo hemípteros que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115. En ciertas modalidades, la expresión de una molécula de ácido nucleico que es idéntica al menos el 80% (por ejemplo, 80%, aproximadamente 81%, 82%, 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, cerca de 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, 90%, 91%, aproximadamente 92%, cerca de 93%, 94%, 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, 100% y 100%) con cualquiera de los anteriores puede utilizarse. En estas y otras modalidades, una molécula de ácido nucleico se hibridiza específicamente a una molécula de ARN presente en

al menos una célula de una plaga de coleópteros puede expresarse.

En algunas modalidades de la invención, la expresión de una molécula de ácido nucleico que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos se utiliza en un método para la inhibición post-transcripcional de un gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros, en donde la secuencia de nucleótidos es seleccionada del grupo formado por: SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133; el complemento de SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133; un fragmento de al menos 15 nucleotidos contiguos de SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133; el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleotidos contiguos de SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131 y SEQ ID NO: 133; una secuencia codificante nativa de organismo *Meligethes* (por ejemplo, EPB) que comprende SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo *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 Meligethers 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 Meligethers 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 una secuencia no codificante no nativa de un organismo 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; un fragmento de al menos 15 nucleotidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo Meligethes (por ejemplo, EPB) 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 de nucleotidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo Meligethes que comprende SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131 o SQ ID NO: 133; un fragmento de al menos 15 nucleotidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo Meligethes que se transcribe en una molécula de ARN nativ 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; y el complemento de un fragmento de al menos 15 nucleotidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo Meligethers que se transcribe en una molécula de

ARN que comprende SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131 y SEQ ID NO: 133. En ciertas modalidades, la expresión de una molécula de ácido nucleico que es idéntica al menos el 80% (por ejemplo, 80%, 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 99%, aproximadamente 100% y 100%) con cualquiera de los anteriores puede utilizarse. En estas y otras modalidades, puede expresarse una molécula de ácido nucleico que se hibridiza específicamente a una molécula de ARN presente en al menos una célula de una plaga de coleópteros y/o hemípteros.

En otras modalidades, la expresión de al menos una molécula de ácido nucleico que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos puede usarse en un método para la inhibición post-transcripcional de un gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros, en donde la secuencia de nucleótidos es seleccionada del grupo formado por: SEQ ID NO: 1; el complemento de SEQ ID NO: 1; un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1; el complemento de un

fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1; una secuencia codificante nativa de un organismo de Diabrotica (por ejemplo, WCR) que comprende SEQ ID NO: 1; el complemento de una secuencia codificante nativa de un organismo de Diabrotica (por ejemplo, WCR) que comprende SEQ ID NO: 1; 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 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 por lo menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de Diabrotica (por ejemplo, WCR) que comprende SEQ ID NO: 1; el complemento de un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo de Diabrotica compuesto por SEQ ID NO: 1; un fragmento de por lo menos 19 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; y el complemento de un fragmento de por lo menos 19 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. En ciertas modalidades, la expresión de una molécula de ácido nucleico que es idéntica al menos el 80% (por ejemplo, 80%, 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 99%, aproximadamente 100% y 100%) con cualquiera de los anteriores puede utilizarse. En estas y otras modalidades, puede expresarse una molécula de ácido nucleico que se hibridiza específicamente a una molécula de ARN presente en al menos una célula de una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En particular los ejemplos, tal una molécula de ácido nucleico puede componerse de una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 1.

En modalidades particulares, la expresión de la molécula de por lo menos un ácido nucleico que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos pueden utilizarse en un método para la inhibición post-transcripcional de un gen objetivo en una plaga de coleópteros, en donde la secuencia de nucleótidos es seleccionada del grupo formado por: SEQ ID NO: 115; el complemento de SEQ ID NO: 115; un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 115; el complemento de un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 115; una secuencia codificante nativa de un organismo hemípteros que comprende SEQ ID NO: 115; el complemento de

una secuencia codificante nativa de un organismo hemípteros que comprende SEQ ID NO: 115; una secuencia no codificante nativa de un organismo hemípteros que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115; el complemento de una secuencia no codificante nativa de un organismo hemípteros que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115; un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo hemípteros que comprende SEQ ID NO: 115; el complemento de un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo hemípteros que comprende SEQ ID NO: 115; un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo hemípteros que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115; y el complemento de un fragmento de por lo menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo hemípteros que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende SEQ ID NO: 115. En ciertas modalidades, la expresión de una molécula de ácido nucleico que es idéntica al menos el 80% (por ejemplo, 80%, 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 99%, aproximadamente 100% y 100%) con cualquiera de los anteriores puede utilizarse. En estas y otras modalidades, puede expresarse una molécula de ácido nucleico que se hibridiza específicamente a una molécula de ARN presente en al menos una célula de una plaga de coleópteros. En ejemplos particulares, tal molécula de ácido nucleico puede componerse de una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 115.

En otras modalidades, la expresión de al menos una molécula de ácido nucleico que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos puede usarse en un método para la inhibición post-transcripcional de un gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros, en donde la secuencia de nucleótidos es seleccionada del grupo formado por: SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133; el complento de 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 16 nucleotidos contiguos de SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124 y SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131, o SEQ ID NO: 133; el complemento de un fragmento de al menos 19 nucleotidos contiguos de 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

organismo de *Meligethes* (por ejemplo, EPB) 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 Meligethes (por ejemplo, EPB) 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 Meligethes que se transcribe en una molécula nativa ARN 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 Meligethes que se transcribe en una molécula nativa ARN 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 19 nucleotidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo Meligethes (por ejemplo, EPB) 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 19 nucleotidos contiguos de una secuencia codificante nativa de un organismo Meligethes que comprende SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133; un fragmento de al menos 19 nucleotidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo *Meligethes* que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende un fragmento de al menos 19 nucleotidos contiguos de una

secuencia no codificante nativa de un organismo Meligethes que se transcribe en una 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 el complemento de un fragmento de al menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante nativa de un organismo *Meligethes* que se transcribe en una molécula de ARN 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 ciertas modalidades, la expresión de una molécula de ácido nucleico que es idéntica al menos el 80% (por ejemplo, 80%, 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 99%, aproximadamente 100% y 100%) con cualquiera de los anteriores puede utilizarse. En estas y otras modalidades, puede expresarse una molécula de ácido nucleico que se hibridiza específicamente a una molécula de ARN presente en al menos una célula de una plaga de coleópteros y/o hemípteros. En ejemplos particulares, dicha molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleotido 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.

Es una característica importante de algunas modalidades de la invención que el sistema de inhibición post-transcripcional ARNi es capaz de tolerar las variaciones de la secuencia entre genes objetivo que podría esperarse debido a la mutación genética, cepa polimorfismo o divergencia evolutiva. La molécula de ácido nucleico introducida no debe ser absolutamente homólogas a un producto primario transcripción o un ARNm completamente procesados de un gen objetivo, mientras que la molécula de ácido nucleico introducido sea hibridizable específicamente a un producto primario transcripción o un ARNm completamente procesados del gen objetivo. Por otra parte, la molécula de ácido nucleico introducida no debe ser de una longitud completa, en relación con un producto de transcripción primario o un ARNm del gen objetivo completament eprocesado.

La inhibición de un gen objetivo usando la tecnología de ARNi de la invención presente es secuencia específica; es decir, secuencias de nucleótidos substancialmente homólogas a la molécula(s) ARNi completamente procesada son destinadas a la inhibición de la genética. En algunas modalidades, una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a una porción de una secuencia del gen objetivo puede utilizarse para la inhibición. En estas y otras modalidades, una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos con uno o más inserciones, borrado, y/o mutaciones de punto en relación con

una secuencia del gen objetivo puede utilizarse. En modalidades particulares, una molécula de ARNi y una porción de un gen objetivo pueden compartir, por ejemplo, al menos de aproximadamente 80%, por lo menos desde aproximadamente 81%, por lo menos de 82%, por lo menos de 83%, por lo menos de aproximadamente el 84%, por lo menos de aproximadamente 85%, por lo menos desde cerca de 86%, por lo menos de aproximadamente 87%, por lo menos desde aproximadamente el 88%, por lo menos de aproximadamente 89%, por lo menos de cerca del 90%, por lo menos de 91%, por lo menos de aproximadamente 92%, al menos de cerca del 93%, por lo menos de 94%, por lo menos de aproximadamente 95%, por lo menos de aproximadamente 96%, por lo menos de aproximadamente 97%, por lo menos de aproximadamente 98%, por lo menos de aproximadamente 99%, por lo menos desde 100% y 100% identidad de secuencia. Alternativamente, la región de dos caras de una molécula de ARNds puede ser específicamente hibridizable con una porción de la transcripción de genes objetivo. En concreto las moléculas hibridizables, una secuencia de longitud menos completo que exhibe una mayor homología compensa una secuencia más larga y menos homóloga. La longitud de la secuencia de nucleótidos de una región dos caras de una molécula de ARNds que es idéntica a una porción de la transcripción de genes objetivo puede ser por lo menos 15, 16, 7, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200, 300, 400, 500, o al menos cerca

de 1000 bases. En algunas modalidades, se puede utilizar una secuencia de más de 15 a 100 nucleótidos. En otras modalidades, puede usarse una secuencia mayor que de aproximadamente 100 a 200 nucleótidos. En particular deben utilizarse modalidades, una secuencia de más de unos 200 a 300 nucleótidos. En modalidades alternativas, puede usarse una secuencia mayor que de aproximadamente 300 a 500 nucleótidos. En particulares modalidades, puede utilizarse una secuencia de más de unos 500 a 1000 nucleótidos, dependiendo del tamaño del gen objetivo.

En ciertas modalidades, la expresión de un gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros puede ser inhibida por al menos 10%; al menos 33%; por lo menos el 50%; o por lo menos 80% dentro de una célula de la plaga de coleópteros y/o hemípteros, tales que se genera una inhibición significativa. La inhibición significativa se refiere a la inhibición sobre un umbral que resulta en un fenotipo detectable (por ejemplo, cese de crecimiento, cese de la alimentación, cese del desarrollo, la mortalidad inducida, etc.), o una disminución perceptible en ARN y/o producto de gen correspondiente al gen objetivo a ser inhibido. Aunque en ciertas modalidades de la invención, la inhibición ocurre en substancialmente todas las células de la plaga de coleópteros y/o hemípteros, en otras modalidades de la inhibición se produce solo en un subconjunto de las células que expresan el gen objetivo.

En algunas modalidades, la represión transcripcional en una célula está mediada por la presencia de una molécula de ARNds exhibiendo identidad substancial secuencia a una secuencia de ADN del promotor o el complemento, a efecto de lo que se conoce como "supresión del promotor trans." La supresión del gen puede ser efectiva contra los genes objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros que pueden ingerir o estar en contacto con estas moléculas de ARNds, por ejemplo, por ingestión o contacto con material vegetal que contiene las moléculas de ARNds. Las moléculas de ARNds para su uso en la trans supresión promotora pueden ser diseñadas específicamente para inhibir o reprimir la expresión de una o más secuencias homólogas o complementarias en las células de la plaga de coleópteros y/o hemípteros. La supresión de genes post-transcripcionales por antisentido o sentido orientado a ARN para regular la expresión génica en células de la planta es divulgada en Estados Unidos patente N° 5,107,065, 5,231,020, 5,283,184 y 5,759,829.

C. Expresión de las moléculas de ARNi proporcionada a una plaga de coleópteros y/o hemípteros

La expresión de moléculas de ARNi para ARNi mediada por la inhibición de genes en un plaga de coleóptero o hemíptero puede realizarse en cualquiera de los muchos

formatos in vitro o in vivo. Las moléculas de ARNi entonces pueden ser proporcionadas a una plaga de coleópteros y/o hemípteros, por ejemplo, contactándose con la plaga las moléculas de ARNi, o causando la plaga a ingerir o lo contrario internalizar las moléculas de ARNi. Algunas modalidades de la invención incluyen plantas hospederas transformadas de una plaga de coleópteros y/o hemípteros, las células vegetales transformadas y progenie de plantas transformadas. Las células vegetales transformadas y plantas transformadas pueden diseñarse para expresar uno o más de las moléculas de ARNi, por ejemplo, bajo el control de un promotor heterólogo, para proporcionar un efecto protector de plagas. Así, cuando una planta transgénica o célula vegetal es consumida por una plaga de coleópteros y/o hemípteros durante la alimentación, las plagas pueden ingerir ARNi moléculas expresadas en las plantas transgénicas o células. Las secuencias de nucleótidos de la invención presente también pueden introducirse en una amplia variedad de los microorganismos procarióticos y eucarióticos para producir moléculas de ARNi. El término "microorganismo" incluye especies procariotas y eucariotas, tales como bacterias y hongos.

La modulación de la expresión génica puede incluir la supresión total o parcial de esa expresión. En otra modalidad, un método para la supresión de la expresión génica en una plaga de coleópteros y/o hemípteros comprende

proporcionar en los tejidos del huésped de la plaga una cantidad represivo del gen de por lo menos una molécula de ARNds formada tras la transcripción de una secuencia de nucleótidos como se describe en este documento, por lo menos un segmento del cual es complementario a una secuencia de ARNm dentro de las células de la plaga de coleópteros y/o hemípteros. Una molécula de ARNds, incluyendo su forma modificada como una molécula de ARNsi, ARNsh, ARNmi o ARNhp, ingerida por un plaga de coleópteros y/o hemípteros de acuerdo con la invención, puede ser al menos de cerca de 80%, 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 99%, aproximadamente 100% o 100% idéntica a una molécula de ARN transcrito de una molécula de ácido nucleico formado por 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. Las moléculas de ácido nucleico aislada y purificada sustancialmente incluyendo pero no limitado a, sin ocurrir de forma natural las secuencias de nucleótidos y ADN recombinante construye para proporcionar moléculas de ARNds

de la invención presente, por lo tanto, cuentan, que suprimen o inhiben la expresión de una secuencia codificante endógena o un objetivo en la plaga de coleópteros y/o hemípteros cuando se introdujo a la misma.

Las modalidades particulares proporcionan un sistema de entrega para la entrega de moléculas de ARNi para la inhibición post transcripcional de los genes objetivo uno o más de una plaga vegetal de coleópteros y/o hemípteros y el control de una población de la plaga vegetal de coleópteros y/o hemípteros. En algunas modalidades, el sistema de suministro comprende la ingestión de una célula vegetal transgénica huésped o el contenido de la célula huésped, compuesto por moléculas de ARN transcritas en la célula huésped. En estas y otras modalidades, una célula vegetal transgénica o una planta transgénica se crea que contiene una estructura de ADN recombinante proporcionando una molécula de ARNds estabilizado de la invención. Las células vegetales transgénicas y las plantas transgénicas que comprende las secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula particular ARNi pueden producirse mediante el empleo de las tecnologías de ADN recombinante (tecnologías básicas que son bien conocidas en el arte) para construir un vector de transformación de plantas que comprende una secuencia de nucleótidos codifican una molécula de ARNi de la invención (por ejemplo, una molécula estabilizada ARNds); para transformar una célula vegetal o plantas; y para generar la

célula vegetal transgénica o las plantas transgénicas que contiene la molécula de ARNi transcrita.

Para impartir resistencia a las plagas de coleópteros y/o hemípteros a una planta transgénica, una molécula de ADN recombinante puede ser transcrito por ejemplo, en una molécula de ARNi, como una molécula de ARNds, una molécula de ARNsi, una molécula de ARNsh, una molécula de ARNmi o una molécula de ARNhp. En algunas modalidades, una molécula de ARN transcrita de una molécula de ADN recombinante puede formar una molécula de ARNds dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante. Dicha molécula de ARNds puede estar compuesta en parte de una secuencia de nucleótidos que es idéntica a una secuencia de nucleótidos correspondientes transcrita de una secuencia de ADN dentro de una plaga de coleópteros y/o hemípteros de un tipo que puede infestar la planta hospedera . La expresión de un gen objetivo dentro de la plaga de coleópteros y/o hemípteros es suprimida por la molécula de ARNds ingerida y la supresión de la expresión del gen objetivo en los resultados de plaga de coleópteros y/o hemípteros en, por ejemplo, cese de la alimentación por la plaga de coleópteros y/o hemípteros, con un resultado final, por ejemplo, que la planta transgénica está protegida de los daños por la plaga de coleópteros y/o hemípteros. Los efectos moduladores de moléculas de ARNds se han demostrado que son aplicables a una variedad de genes expresados en plagas, incluyendo, por ejemplo, genes

endógenos responsables del metabolismo celular o transformación celular, incluyendo genes de mantenimiento de la casa; factores de transcripción; genes relacionados con muda; y otros genes que codifican polipéptidos involucrados en el metabolismo celular o el crecimiento normal y desarrollo.

Para la transcripción de un transgen en vivo o un constructo de expresión, una región reguladora (por ejemplo, promotor, potenciador, silenciador y señal de poliadenilación) puede utilizarse en algunas modalidades para transcribir la hebra de ARN (o hebras). Por lo tanto, en algunas modalidades, como se establece anteriormente, una secuencia de nucleótidos para su uso en la producción de moléculas de ARNi puede estar operablemente ligada a una o más secuencias promotoras funcionales en una célula vegetal huésped. El promotor puede ser un promotor endógeno, normalmente residente en el genoma del anfitrión. La secuencia nucleotídica de la invención presente, bajo el control de una secuencia promotor operablemente vinculado, además puede ser flanqueada por secuencias adicionales que afectan ventajosamente su transcripción y/o la estabilidad de una transcripción resultante. Tales secuencias pueden estar situadas aguas arriba del promotor operablemente enlazado, aguas abajo del extremo 3' de la construcción de la expresión y pueden ocurrir tanto aguas arriba del promotor y aguas abajo del extremo 3' de la construcción de la expresión.

Algunas modalidades proporcionan métodos para reducir el daño a la planta de huésped (por ejemplo, una planta de maíz o soja) causada por una plaga de coleópteros y/o hemípteros que se alimenta de la planta, en donde el método comprende proporcionando en el huésped una célula vegetal transformada expresando por lo menos una molécula de ácido nucleico de la invención, en donde funciona(n) la(s) molécula(s) de ácido nucleico luego de ser tomada(s) por la plaga de coleópteros y/o hemípteros para inhibir la expresión de una secuencia objetivo dentro de la plaga de coleópteros y/o hemípteros, en donde la inhibición de la expresión resulta en la mortalidad, la reducción del crecimiento o reproducción de la plaga de coleópteros y/o hemípteros, reduciendo los daños a la planta hospedera causada por el parásito de coleópteros y/o hemípteros reducido. En algunas modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico forma(n) moléculas de ARNds. En estas y otras modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico comprende(n) moléculas de ARNds que cada uno compone de más de una secuencia de nucleótidos es específicamente hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros y/o hemípteros. En algunas modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico consiste(n) en una secuencia de nucleótidos es específicamente hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros y/o hemípteros.

En otras modalidades, se proporciona un método para aumentar el rendimiento de un cultivo de maíz o de soja, en donde el método comprende introducir en una planta de maíz o de soja por lo menos una molécula de ácido nucleico de la invención; cultivar la planta de maíz o soja para permitir la expresión de la molécula de ARNi que comprende la secuencia de ácido nucleico, en el cual la expresión de la molécula de ARNi que comprende la secuencia de ácido nucleico inhibe el crecimiento de la plaga de hemípteros, coleópteros y/o daños provocados por plagas de coleópteros y/o hemípteros, reduciendo o eliminando así una pérdida de rendimiento debido a la infestación de plagas de coleópteros y/o hemípteros. En algunas modalidades, la molécula de ARNi es una molécula de ARNds. En estas y otras modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico comprende(n) moléculas de ARNds que cada uno compone más de una secuencia de nucleótidos que es específicamente hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros y/o hemípteros. En algunas modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico consiste(n) en una secuencia de nucleótidos es específicamente hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros y/o hemípteros.

En modalidades particulares, se proporciona un método para modular la expresión de un gen objetivo en una plaga de coleópteros y/o hemípteros: el método comprende:

transformación de una célula vegetal con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos una molécula de ácido nucleico de la invención, en donde la secuencia de nucleótidos es operativamente vinculada a una promotora y una secuencia de terminación de transcripción; cultivo de la célula vegetal transformada en condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo de célula vegetal incluyendo una pluralidad de células vegetales transformadas; selección para las células vegetales transformadas que se han integrado a la molécula de ácido nucleico en sus genomas; detección de las células de la planta transformada para la expresión de una molécula de ARNi codificada por la molécula de ácido nucleico integrado; selección de una célula vegetal transgénico que expresa la molécula de ARNi; y alimentación de la célula vegetal transgénica seleccionada a la plaga de coleópteros y/o hemípteros. Las plantas también pueden ser regeneradas de células vegetales transformadas que expresan una molécula de ARNi codificada por la molécula de ácido nucleico integrado. En algunas modalidades, la molécula de ARNi es una molécula de ARNds. En estas y otras modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico comprende(n) moléculas de ARNds que cada uno compone de más de una secuencia de nucleótidos es específicamente hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros y/o hemípteros. En algunas modalidades, la(s) molécula(s) de

ácido nucleico consiste(n) en una secuencia de nucleótidos es específicamente hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de coleópteros y/o hemípteros.

Las moléculas de ARNi de la invención pueden ser incorporadas dentro de las semillas de una especie vegetal (por ejemplo, maíz o soja), ya sea como un producto de la expresión de un gen recombinante incorporado en el genoma de las células vegetales o incorporado en una capa o tratamiento de semilla que se aplica a la semilla antes de plantar. Una célula vegetal que comprende un gen recombinante se considera que es un evento transgénico. En las modalidades de la invención también figuran sistemas de suministro para el suministro de las moléculas de ARNi a plagas de coleópteros y/o hemípteros. Por ejemplo, las moléculas de la invención de ARNi pueden introducirse directamente en las células de una plaga de coleópteros y/o hemípteros. Los métodos para la introducción pueden incluir mezcla directa de ARNi con tejido vegetal desde un huésped para la plaga de coleópteros o hemípteros, así como aplicación de composiciones que comprende moléculas de ARNi de la invención para el tejido de la planta huésped. Por ejemplo, las moléculas de ARNi se pueden rociar sobre una superficie de planta. Alternativamente, una molécula de ARNi puede ser expresada por un microorganismo, y el microorganismo puede ser aplicado sobre la superficie de la planta, o introducido en una raíz o

tallo por un medio físico como una inyección. Como hemos comentado anteriormente, una planta transgénica puede también ser genéticamente ideada para expresar al menos una molécula de ARNi en una cantidad suficiente para matar las plagas de coleópteros y/o hemípteros conocidas por infestar la planta. Las moléculas de ARNi producidas por síntesis química o enzimática también pueden ser formuladas de una manera consistente con las prácticas agrícolas comunes y usadas como pulverización en productos para el control de daños a las plantas por una plaga de coleópteros y/o hemípteros. Las formulaciones pueden incluir las etiquetas adecuadas y objetos húmeros requeridos para la eficiente cobertura foliar, así como los protectores de rayos UV para proteger las moléculas de ARNi (por ejemplo, las moléculas de ARNds) contra daño UV. Dichos aditivos se usan comúnmente en la industria del bioinsecticida y son bien conocidos por los técnicos en la materias. Estas aplicaciones pueden combinarse con otro spray en aplicaciones de insecticidas (biológicamente basadas u otra) para mejorar la protección de las plantas de las plagas de coleópteros y/o hemípteros.

Todas las referencias que discuten en este documento, incluyendo publicaciones, patentes y solicitudes de patente, citados en el presente documento, se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la solicitud actual. Nada en el presente documento pretende ser interpretado como una admisión de que