

SUPRESIÓN DE ARNI PARENTAL DE GEN *HUNCHBACK* PARA EL CONTROL DE LAS PLAGAS DE HEMÍPTEROS

Reivindicación de prioridad

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de
presentación de la Solicitud de Patente Provisional Estadounidense
Número 62/092,776, presentada el 16 de diciembre de 2014, para
“SUPRESIÓN DE ARNI PARENTAL DE GEN *HUNCHBACK* PARA EL
CONTROL DE LAS PLAGAS DE HEMÍPTEROS “cuya divulgación se
10 incorpora en el presente documento en su totalidad como referencia.

Campo de la Invención

 La presente invención se relaciona en general con el control
genético del daño en las plantas ocasionado por las plagas de
hemípteros. En modalidades particulares, la presente invención se
15 relaciona con la identificación de polinucleótidos codificantes y no
codificantes objetivo, y el uso de tecnologías de ADN recombinante
para la represión o inhibición post-transcripcional de la expresión de
los polinucleótidos codificantes y no codificantes objetivo en las
células de una plaga de hemípteros de modo de proveer un efecto
20 protector para las plantas.

Antecedentes de la Invención

 Las chinches y otros insectos hemípteros (heterópteros) son un
importante complejo de plagas agrícolas. Alrededor del mundo se
conocen más de 50 especies estrechamente relacionadas de
25 chinches que ocasionan daños a las cosechas. McPherson &

McPherson (2000) Stink bugs of economic importance in America north of Mexico, CRC Press. Estos insectos están presentes en una gran cantidad de cosechas importantes incluyendo maíz dulce, frijol de soya, fruta, vegetales y cereales.

5 Las chinches pasan por múltiples etapas de ninfa antes de alcanzar la etapa adulta. El tiempo para desarrollarse de huevos a adultos es de aproximadamente 30 a 40 días. Tanto las ninfas como los adultos se alimentan de la savia de los tejidos blandos en los cuales ellos también inyectan enzimas digestivas ocasionando la
10 digestión y necrosis del tejido extra oral. El material y los nutrientes de la planta digeridos son entonces ingeridos. El agotamiento del agua y los nutrientes del sistema vascular de la planta da como resultado el daño del tejido de la planta. El daño en el desarrollo del grano y las semillas es lo más significativo puesto que la producción
15 y germinación se ven fuertemente reducidas. Múltiples generaciones se producen en climas cálidos lo que resulta en una presión significativa por parte de los insectos. El manejo actual de las chinches se basa en el tratamiento con insecticidas caso por caso. Por lo tanto, las estrategias de manejo alternativas son necesarias
20 de manera urgente a fin de minimizar las constantes pérdidas de los cultivos.

La interferencia por ARN ((iARN)) es un proceso que utiliza trayectorias celulares endógenas, por medio de las cuales una molécula de ARN interferente (ARNi) (por ejemplo, una molécula de
25 ARN de doble hebra (ARNdh)) que es específica para toda, o

cualquier porción de tamaño adecuado, de una secuencia de gen objetivo resulta en la degradación del ARNm codificado de este modo. En años recientes, la iARN se ha utilizado para realizar la “inactivación” del gen en una cantidad de especies y sistemas
5 experimentales; por ejemplo, *Caenorhabditis elegans*, plantas, embriones de insectos, y células en el cultivo de tejidos. Ver, por ejemplo, Fire *et al.* (1998) Nature 391:806-811; Martinez *et al.* (2002) Cell 110:563-574; McManus y Sharp (2002) Nature Rev. Genetics 3:737-747.

10 El iARN lleva a cabo la degradación del ARNm a través de una trayectoria endógena incluyendo el complejo proteico DICER. DICER escinde las moléculas de ARNd_h largas en fragmentos cortos de aproximadamente 20 nucleótidos, denominado ARN interferente pequeño (ARNip). El ARNip es desenrollado en dos ARN de una sola
15 hebra: la hebra pasajero y la hebra guía. La hebra pasajero es degradada, y la hebra guía es incorporada en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC). Los ácidos ribonucleicos microinhibidores (miARN) son moléculas estructuralmente muy similares que se escinden de las moléculas precursoras que contienen un “asa” de
20 polinucleótido que conecta las hebras hibridizadas de guía y pasajero, y pueden similarmente incorporarse en RISC. El silenciamiento del gen post-transcripcional se produce cuando la hebra guía se enlaza de manera específica a una molécula de ARNm complementaria e induce la escisión mediante Argonaute, el
25 componente catalítico del complejo RISC. Este proceso es conocido

por dispersar de forma sistemática a través de algunos organismos eucarióticos a pesar de las concentraciones inicialmente limitadas de ARNip y/o miARN tales como plantas, nematodos, y algunos insectos.

5 Solamente los transcritos complementarios a ARNip y/o miARN son escindidos y separados, y así la inactivación (“knock-down”) de la expresión de mRNA es específica de la secuencia. En las plantas, existen diversos grupos funcionales de genes DICER. El efecto silenciador de gen de ARNi persiste por días, y bajo condiciones
10 experimentales, puede llevar a una caída en abundancia del transcripto objetivado del 90% o más, con la consecuencia reducción en niveles de la correspondiente proteína. En insectos, existen por lo menos dos genes DICER, en donde DICER1 facilita la degradación dirigida al miARN por Argonaute1. Lee *et al.* (2004) Cell 117(1):69-
15 81. DICER2 facilita la degradación dirigida por mediante Argonaute2.

Una abrumadora mayoría de secuencias complementarias a ADNs de insecto (tal como, por ejemplo, las más de 9,000 secuencias identificadas en la Patente de EEUU. 7,612,194 y las Patentes de EE.UU. Publicaciones Nos. 2007/0050860,
20 2010/0192265, y 2011/0154545) no proporcionan un efecto protector para plantas cuando se utilizan como ARNdh o ARNip. Por ejemplo, Baum *et al.* (2007) Nature Biotechnology 25:1322-1326, describe los efectos de inhibir varios objetivos de genes de WCR por ARNi. Estos autores informaron que 8 de los 26 genes objetivo que ensayaron no
25 pudieron proporcionar mortalidad de plaga de coleópteros

experimentalmente importante a una concentración muy alta de iARN (por ej., ARNdh) de más de 520 ng/cm².

Los autores de la Patente Estadounidense No. 7,612,194 y la publicación de Patente Estadounidense No. 2007/0050860 hicieron el primer reporte de iARN *in planta* en las plantas de maíz fijando como
5 objetivo el gusano de la raíz del maíz del oeste. Baum *et al.* (2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-6. Estos autores describen un sistema alimentario por iARN *in vivo* de gran rendimiento para identificar los genes objetivo potenciales para el desarrollo de maíz dulce por iARN transgénico. De un banco de genes inicial de 290 objetivos,
10 solamente 14 exhibieron potencial para el control de las larvas. Uno de los ARN de doble hebra más efectivos (ARNdh) se enfocó en un gen que codifica la subunidad A de ATPasa vacuolar (V-ATPasa), resultando en una supresión rápida del ARNm endógeno
15 correspondiente y provocando una respuesta específica por iARN con bajas concentraciones de ARNdh. Por consiguiente, estos autores documentaron por primera vez el potencial para la iARN *in planta* como una posible herramienta para el manejo de las plagas, mientras que de manera simultánea demostraron que objetivos
20 efectivos pueden no ser identificados con exactitud *a priori*, incluso a partir de un conjunto relativamente pequeño de genes candidatos.

Otra potencial aplicación de ARNi para control de insectos comprende ARNi parental (pRNAi). Primero descrito en *Caenorhabditis elegans*, pARNi se identificó por inyección de ARNdh
25 en la cavidad del cuerpo (o aplicación ARNdh *via* ingestión),

causando la inactividad de genes en embriones de progenie. Fire *et al.* (1998), *supra*; Timmons y Fire (1998) *Nature* 395(6705):854. Un proceso similar fue descrito en el coleóptero modelo, *Tribolium castaneum*, en donde la pupa femenina fue inyectada con dsARN correspondiente a tres genes únicos que controlan la segmentación durante el desarrollo embriónico que resultó en inactivación de genes cigóticos en embriones de progenie. Bucher *et al.* (2002) *Curr. Biol.* 12(3):R85-6. Casi la totalidad de las larvas de progenie en este estudio exhibieron fenotipos específicos de gen una semana después de la inyección. Aunque la inyección de dsARN para estudios genómicos funcionales ha resultado exitosa en una variedad de insectos, la captación de dsARN a partir del medio intestinal a través de exposición oral a dsARN y subsiguiente reducción de genes esenciales es necesaria a fin de que ARNi resulte efectivo como una herramienta para el manejo de plagas. Auer and Frederick (2009) *Trends Biotechnol.* 27(11):644-51.

El ARNi parental se ha utilizado para describir la función de genes embriónicos en una cantidad de especies de insectos, incluyendo, *springtail* (pulguilla), *Orchesella cincta* (Konopova and Akam (2014) *Evodevo* 5(1):2); la langosta marrón, *Nilaparvata lugens*; la mosca del nabo, *Athalia rosae* (Yoshiyama *et al.* (2013) *J. Insect Physiol.* 59(4):400-7); la cucaracha alemana, *Blattella germanica* (Piulachs *et al.* (2010) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40:468-75); y el pulgón de la alfalfa, *Acyrtosiphon pisum* (Mao *et al.* (2013) *Arch Insect Biochem Physiol* 84(4):209-21). La respuesta de pIARN

en todos estos casos se logró mediante inyección de dsARN en el hemocoel del parental femenino.

Breve Descripción de la Invención

En el presente documento se divulgan moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, genes objetivo, ADN, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, y ARNhp), así como los métodos de uso de las mismas, para el control de las plagas de hemípteros, tales como *Euschistus heros* (Fabr.) (Chinche Marrón del Neotrópico, “BSB”); *E. servus* (Say) (Chinche Marrón); *Nezara viridula* (L.) (Chinche Verde del Sur); *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Chinche verde pequeña); *Halyomorpha halys* (Stål) (Chinche Marrón Marmórea); *Chinavia hilare* (Say) (Chinche Verde); *C. marginatum* (Palisot de Beauvois); *Dichelops melacanthus* (Dallas); *D. furcatus* (F.); *Edessa meditabunda* (F.); *Thyanta perditor* (F.) (Chinche de hombros rojos del neotrópico); *Horcias nobilellus* (Berg) (Chinche de Algodón); *Taedia stigmosa* (Berg); *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Ménéville); *Neomegalotomus parvus* (Westwood); *Leptoglossus zonatus* (Dallas); *Niesthrea sidae* (F.); *Lygus hesperus* (Knight) (Chinche Opaca de las Plantas del Oeste); y *L. lineolaris* (Palisot de Beauvois). En ejemplos particulares se divulgan moléculas de ácido nucleico ejemplares que pueden ser homólogas a por lo menos una porción de uno o más ácidos nucleicos nativos en una plaga de hemípteros. En algunas modalidades, las plagas de hemípteros se controlan reduciendo la capacidad de una generación existente de la plaga para producir una generación subsiguiente de la plaga. En ciertos ejemplos, el

suministro de moléculas de ácido nucleico a plagas de hemípteros no produce mortalidad importante en las plagas, pero reduce el número de progenie viable producida a partir del mismo.

En éstos y otros ejemplos adicionales, el ácido nucleico nativo
5 puede ser un gen objetivo, el producto del cual puede estar, por ejemplo y sin limitación: involucrado en un proceso metabólico o involucrado en el desarrollo de larvas/ ninfas. En algunos de los ejemplos, la inhibición post-transcripción de la expresión de un gen objetivo mediante una molécula de ácido nucleico que comprende un
10 polinucleótido homólogo al mismo puede resultar en el crecimiento y/o desarrollo reducido de las plagas de hemípteros. En los ejemplos específicos, un gen *Hunchback* puede ser seleccionado como un gen objetivo para el silenciamiento post-transcripcional. En los ejemplos particulares, un gen objetivo útil para la inhibición post-
15 transcripcional es un gen novedoso referido en el presente documento como *BSB hunchback* (SEQ ID NO:1), referido en la presente en algunos casos como *BSB_hb* Una molécula aislada de ácido nucleico que comprende el polinucleótido de la SEQ ID NO:1, el complemento de la SEQ ID NO:1, y/o fragmentos de cualquiera de
20 las anteriormente mencionadas (por ejemplo, SEQ ID NO: 2) se divulga por lo tanto en el presente documento.

También se divulgan moléculas de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que es por lo menos aproximadamente 85% idéntico a una secuencia de
25 aminoácidos dentro de un producto de gen objetivo (por ejemplo, el

producto de un gen *hunchback*). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido que es por lo menos 85% idéntico a SEQ ID NO:3 (BSB HUNCHBACK); y/o una secuencia de aminoácidos dentro de un

5 producto de *BSB_hb*. Además se divulgan moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que es el complemento inverso de un polinucleótido que codifica un polipéptido por lo menos 85% idéntico a una secuencia de aminoácidos dentro de un producto de gen objetivo.

10 También se divulgan polinucleótidos de ADNc que se pueden utilizar para la producción de moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, y ARNhp) que son complementarias para todo o parte de un gen objetivo de la plaga de hemípteros, por ejemplo, un gen *hunchback*. En modalidades particulares, los ARNdh,

15 ARNip, miARN, ARNhc, y/o ARNhp pueden ser producidos *in vitro*, o *in vivo* por medio de un organismo genéticamente modificado, tal como una planta o una bacteria. En los ejemplos particulares, se divulgan moléculas de ADNc que se pueden utilizar para producir moléculas de ARNi que son complementarias a todo o parte del

20 mRNA transcrito de *BSB_hb* (SEQ ID NO:1).

Además se divulgan medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de hemípteros, así como los medios para proteger una planta de las plagas de hemípteros. Un medio para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de hemípteros

25 es una molécula de ARN de una sola hebra codificada por un

polinucleótido que se selecciona del grupo que consiste de cualquiera de las SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO: 13, y los complementos de las mismas. Los equivalentes funcionales de los medios para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de hemípteros incluyen moléculas de ARN de una sola hebra que son sustancialmente homólogas a todo o parte de un transcripto de un gen BSB que comprende la SEQ ID NO:1. Un medio para la protección de una planta de las plagas de hemípteros es una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un medio para inhibir la expresión de un gen esencial en una plaga de hemípteros operativamente enlazado a un promotor, en donde la molécula de ADN está en capacidad de ser integrada en el genoma de una planta de maíz.

Se divulgan métodos para controlar la población de una plaga de hemípteros, que comprenden proveer a una plaga de hemípteros una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNd_h, ARNi_p, ARNh_c, miARN, y ARNh_p) que funciona al ser tomada por la plaga para inhibir una función biológica dentro de la plaga, en donde la molécula de ARNi comprende todo o parte de (por ejemplo, por lo menos 15 nucleótidos contiguos de) un polinucleótido que se selecciona del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1; el complemento de SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; el complemento de SEQ ID NO:2; un polinucleótido de codificación nativo de un organismo hemíptero (*por ej.*, BSB) que comprende la totalidad o parte de SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:2; el complemento de un polinucleótido de codificación nativo de un

organismo hemíptero que comprende la totalidad o parte de SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:2; un polipéptido no codificante nativo de un organismo hemíptero que se transcribe en una molécula de ARN nativo que comprende la totalidad o parte de SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:2; y el complemento de un polinucleótido no codificante nativo de un organismo hemíptero que se transcribe en una molécula de ARN nativa que comprende la totalidad o parte de SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:2.

En ejemplos particulares, se describen métodos para controlar una población de plagas de hemípteros, que comprenden proporcionar a una plaga de hemípteros una molécula de iARN (*por ej.*, ARNdh, ARNip, ARNhc, miRNA, y ARNhc) que funciona al ser captada por la plaga para inhibir una función biológica dentro de la plaga, en donde la molécula de iARN comprende un polinucleótido seleccionado entre el grupo formado por la totalidad o parte de: SEQ ID NO:12; el complemento de SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:13; el complemento de SEQ ID NO:13; un polinucleótido que se hibridiza en un polinucleótido de codificación nativo de un organismo hemíptero (*por ej.*, BSB) que comprende la totalidad o parte de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2; y el complemento de un polinucleótido que se hibridiza en un polinucleótido de codificación nativo de un organismo hemíptero (*por ej.*, BSB) que comprende la totalidad o parte de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2.

También se divulgan en el presente documento métodos en donde los ARNdh, ARNip, ARNhc, miARN, y/o ARNhp pueden ser

suministrados a una plaga de hemípteros en un ensayo basado en una dieta, o en células de plantas genéticamente modificadas que expresan los ARNdh, ARNip, ARNhc, miARN y/o ARNhp. En estos y otros ejemplos adicionales, los ARNdh, ARNip, ARNhc, miARN, y/o ARNhp pueden ser ingeridos por la plaga de hemípteros. La ingestión de ARNdh, ARNip, ARNhc, miARN y/o ARNhp de la invención puede resultar en ARNi en la plaga, que a su vez puede resultar en silenciamiento de un gen esencial para un proceso metabólico; un proceso reproductivo; y/o desarrollo de ninfas. Así, se divulgan métodos en donde las moléculas de ácido nucleico que comprenden ejemplos de polinucleótido(s) útiles para control parental de plagas de hemípteros son proporcionadas a una plaga de hemípteros. En ejemplos particulares, la plaga de hemíptero controlada por el uso de moléculas de ácido nucleico de la invención puede ser BSB. En algunos ejemplos, el suministro de las moléculas de ácido nucleico a plagas de hemípteros no resulta en mortalidad significativa de las plagas, sino que reduce el número de progenie viable producida a partir de las mismas. En algunos ejemplos, el suministro de moléculas de ácido nucleico a plagas de hemípteros resulta en mortalidad significativa de las plagas, y también reduce el número de progenie viable producida a partir de las mismas.

Las características anteriores y otras resultarán más evidentes a partir de la siguiente Descripción Detallada de las diversas modalidades, que continúa con la referencia a las Figuras anexas.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** incluye una representación de la estrategia utilizada para la generación de ARNdh a partir de una única plantilla de transcripción con un único par de cebadores (FIG. 1A) y a partir
5 dos plantillas de transcripción (FIG:1B).

La **Figura 2** incluye un resumen de datos de modelado que muestra los efectos de los pARNi particulares sobre adultos de BSB femenino que emerjan de un “parche de refugio” (es decir no expresaron iARNs o proteínas recombinantes en un cultivo
10 transgénico) sobre la tasa de aumento en frecuencias de alelos para resistencia a una proteína insecticida (R) y ARNi (Y) cuando las plantas sin refugio expresan la proteína insecticida y el iARN activo parental.

La **Figura 3** incluye un resumen de datos de modelado que
15 muestran el efecto de magnitud relativa de un efecto de pARNi en adultos de BSB hembras que emergen de un “parche de refugio” (es decir que no expresan iARNs insecticida o proteínas recombinantes en un cultivo transgénico de plantas que comprenden dsARN que interfieren con ninfa activa de BSB en combinación con la proteína
20 insecticida activa en BSB en el cultivo transgénico) a la velocidad de aumento en frecuencias de alelos para resistencia a una proteína insecticida (R) y ARNi(Y) cuando las plantas que no son refugio expresan la proteína insecticida y ambas moléculas de iARN activo parental y activo en larvas.

25 **Figura 4.** Nivel de transcrito relativo para genes de *hunchback*

(*hb*) en los ovarios de hembras *E. heros*. Los insectos no inyectados con dsARN se utilizaron como una referencia; los insectos inyectados con dsARN de *YFP* se utilizaron como un control negativo. Se realizaron comparaciones medias con el ensayo de Dunnett utilizando insectos no inyectados como controles. ** indica importancia en $p < 0.001$.

Figura 5. Tasas de ovoposición, desarrollo y recolección de huevos de hembras *E. heros* inyectadas con dsARN de *hunchback*. Las hembras fueron inyectadas con dsARN en días 0 a 2 con posterioridad a la muda de adulto. Los conteos se basan en 1342 huevos de ovoposición por hembras no inyectadas, 1202 huevos por hembras inyectadas con dsARN de *YFPv2*, y 922 huevos por hembras inyectadas con dsARN de *hb* en un período de dos semanas. Los huevos fueron recolectados en forma diaria comenzando a los 7 días post-inyección; las tasas de desarrollo y recolección son intervalos semanales.. **A.** Numero de huevos de ovoposición por día por hembra y promediados en intervalos semanales. **B.** El porcentaje de huevos que se desarrollaron después de la etapa de pigmentación de cabeza visible **C.** Percentiles de huevos recolectados de los huevos de ovoposición durante las semanas una y dos de recolección de huevos. Se realizaron comparaciones medias con el ensayo de Dunnett utilizando insectos no inyectados como controles, ** indica importancia en $p < 0,001$.

FIG. 6. Fenotipos de dsARN de *hunchback* parentales. Las hembras *E. heros* fueron inyectadas con dsARN en los días 0 a 2

post muda de adulto. **A.** Un embrión de cuatro días diseccionado de un huevo de hembra inyectada con dsARN de *hb*. El embrión exhibe un fenotipo que incluye miembros acortados y estructuras de cabeza.

B. Un embrión de cuatro días de una hembra no inyectada muestra la
5 disposición normal de estructuras de cabeza y miembros en desarrollo. **C.** Un embrión de dos días a partir de una hembra no inyectada muestra una etapa anterior de desarrollo con orejuelas elongadas.

Información sobre el listado de secuencias

10 Las secuencias de ácido nucleico que se enumeran en el listado de secuencias anexo se muestran utilizando las abreviaturas de letras estándares para las bases de nucleótidos, tal como se define en el 37 C.F.R. Párrafo 1.822. El ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos listadas definen moléculas (es decir,
15 polinucleótidos y polipéptidos, respectivamente) que tienen los monómeros de nucleótido y aminoácido dispuestos en la manera descrita. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácido listadas cada una también definen un género de polinucleótidos o polipéptidos que comprenden los monómeros de nucleótido y
20 aminoácido dispuestos en la manera descrita. En vista de la redundancia del código genético, se entenderá que una secuencia de nucleótidos que incluye una secuencia codificante también describe el género de polinucleótidos que codifican el mismo polipéptido que un polinucleótido consistente de la secuencia de referencia. Se
25 entenderá además que una secuencia de aminoácidos describe el

género de polinucleótidos ORF que codifican dicho polipéptido.

Solamente se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero es entendido que la hebra complementaria está incluida para cualquier referencia a la hebra exhibida. Ya que el
 5 complemento y complemento inverso de una secuencia primaria de ácido nucleico son necesariamente divulgados por la secuencia primaria, la secuencia complementaria y la secuencia complementaria inversa de una secuencia de ácido nucleico son incluidas para cualquier referencia a la secuencia de ácido nucleico,
 10 a menos que se indique de manera explícita lo contrario (o sea evidente que es lo contrario a partir del contexto en el cual aparece la secuencia). Además, tal como se entiende en el arte que la secuencia de nucleótidos de una hebra de ARN es determinada por la secuencia del ADN de la cual fue transcrita (pero para la
 15 sustitución de las nucleobases de uracilo (U) para la timina (T)), una secuencia de ARN es incluida para cualquier referencia a la secuencia de ADN que la codifica. En el listado de secuencias adjunto:

La SEQ ID NO:1 muestra un ejemplo de ADN de *BSB_hb*:

20 GCCCTTTGGGTTTAGTTCTCTACGAGCTGCTCTACCATCCACTAGGACTAGCT
 CTATCTTCTCTCTTATATTAGTTCTGGATATATATCTCTCTCTCTATCTATAT
 CTACAGCTGGGAACACCGTAGTCGTCTTTTGTTTTATATATATTGCCTGCATGT
 TGAATGAGATGATTATAACTCCTGATATATACTTTAACAATCCGAGGATGAAC
 ATCGGTGTGCAATACGACCCAAGGCATTCCGTCTTCCCGAATTTGGAGCACC
 25 ATCCATGGATGGCTTCCCCGACTCCGGCACAAGTCGTAAAGAGGAGCCGC

GAGATGACGCGGAGTACGGTCAGAACAGCCAGGAGAGCCAGCTGCCGCTGA
 CGCCGCCCCCTTCCAGGGCTACCCCCCGGGGAACACCTACCGCGAGGCCA
 CGCCCCCTAAGGATACGCCCCCGCCTCCACCCCCTCGCCTCAGGAGAAGC
 AGGAAGGCAGCTCCAACCTCCGAGGGAGAGTACTACGAGAGCGGAGAGTCCC
 5 TAAAGAGGCTGCAGATGGCCCTCCATAGGACCGGGATGATAACGGAGGAGA
 AGCTGCAATGTCCTGTATGCGAGTTCTCTTGCAGTGTCAGGTCACAGTTCAAT
 GAACACCTATTGTCACACGAGACTAAATGTTCCATGTGCGACTTCAGTGGAGA
 AACCAGTGAAAAATTGAGAGAGCACATGAGGAATGTCCACGACTGCGATGAT
 GACAGCAGCTGGGGAGAAGAAGAGCTCAACACTCCCAAAGTCAATTCTCAGG
 10 GAAAGGTCAAAACGTTTCGCTGCAAGCAGTGTGAGTTTTTCAGCTGTGACGAA
 ACTAGAATTTTGGGATCACTCTCGCACCCACATCAAACAGGAGCGATTGCTCA
 CTTGCCCAAAGTGCCCATTCGTCACTGAATACAAACACCATCTCGAATACCAT
 TTGAGGAATCATTTTGGATCGAAACCGTTCAAGTGTGACAAGTGTTCTACTC
 TTGCGTGAACAAATCCATGCTCAATTCTCACTTGAAAAGTCACAGCAACATTTA
 15 CCAGTTCAGATGTGCTGATTGCACCTACGCTACTAAGTATTGTCACAGCTTGA
 AGCTGCATCTGAGAAAATATGCTCACAACCCAGCCATGGTTCTTAACCCTGAC
 GGTTCTCCTAATCCTCTACCAATCGTAGATGTATATGGAAGTAGGCGTGGTCC
 AAAGCAGAAGCCCAAGAATGAACAGCAACCACAACAACCGCCGCAGGTCCC
 GACTATTTTCAACCCATATTCCTTACTTCCAACACAGATGCCATATTACAACAT
 20 CCTTAATGGATTTGGAGGATTTCCTTTCCCACAAGATGTTAACATGGAAGAGA
 AAAACAACAATGTTGAAAAAGAAGAGATCAGAGAAGATAAAGCTCCTCTTGAC
 TTGAGCTGCCCTGAACCGATGGTAGAAGACAGCAATCAAGAAGCCCCAGTGA
 AAAACCGTAGAAAAGGGAAAGCCTTCAAACCTTGACAGAATCGCCCTTCGCCT
 ACAGCAGCAAGTCGAAGTGGAAGAGCAGCCAGAACCGCCAAAACCGATCCC
 25 ACCACCTGTGGTTTCCGAGCCGGCAAAATCACCTGAAATTAAGTCCTGCGAA

GCTGACAGCGAGCAGCAGAAGGTGGAGAAAACAGAACAGGAGAATGTGTAT
 AGTTGCACTTTTTGTGATATTTTATTTAAGGACATTGTTATGTATACAATGCATA
 TGGGTTACCATGGCTACGAAGACCCCTTCAAGTGCAACATGTGCGGGCAGCA
 AACAAACCGACAAGGTTTCTTTCTTCCTCCACATTGCAAGAACATCACACTCAT
 5 AAGGATTACAATTCTATTATTAATCAAATAGATTTTTTTCTGGTTTTAAAAGAGA
 ATCCAACCTTGTTACCCAGTTCAGTCATTAAGTGTCTCTCGTGGCAGTTTATGTA
 AATATTTATTATATCATCATTTAGATTATTAATATATTATTTTCCAGATATATTTA
 GCGTTGGTGTCTAGTCATGTGTATAACAACATAATGTGTAAAAAAAAAATGTG
 GAATTAGGAAATAGTGTCTAACATATGAAATATGTAAACAAGAGAAAGGAAT
 10 AACAAAAATGTTAAAAGTAATTAACATTATTAAGAATATTTGAAAAACAATATTA
 TGTTCCCTTCTAATGTTAATGAGCGAGTAAAAAAGTTAAAACGATTGCATAGT
 TTTAAGGTATTTTATAGCCG

SEQ ID NO:2 muestra un ejemplo de ADN *E. heros hunchback*,
 del cual se transcribe una hebra complementaria para convertirse en
 15 la hebra de sentido de un ejemplo de dsARN de *BSB hunchback*
 (BSB_hb-1):

GTCCACGACTGCGATGATGACAGCAGCTGGGGAGAAGAAGAGCTCAACACT
 CCCAAAGTCAATTCTCAGGGAAAGGTCAAACGTTTCGCTGCAAGCAGTGTG
 AGTTTTCAGCTGTGACGAACTAGAATTTTGGGATCACTCTCGCACCCACATC
 20 AAACAGGAGCGATTGCTCACTTGCCCAAAGTGCCCATTCGTCACTGAATACAA
 ACACCATCTCGAATACCATTTGAGGAATCATTTTGGATCGAAACCGTTCAAGT
 GTGACAAGTGTTCTACTCTTGCGTGAACAAATCCATGCTCAATTCTCACTTG
 AAAAGTCACAGCAACATTTACCAGTTCAGATGTGCTGATTGCACCTACGCTAC
 TAAGTATTGTCACAGCTTGAAGCTGCATCTGAGAAAATATGCTCACAACCCAG
 25 CCATGGTTCTTAACCCTGACGGTTCCTAATCCTCTACCAATCGTAG

SEQ ID NO:3 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de *BSB HUNCHBACK* codificado por un ejemplo de ADN de *BSB_hb*:

MIITPDIYFNNPRMNIGVQYDPRHSVFPNLEHHPWMASPTPAQVVKEEPRDDAEY
 5 GQNSQESQLPLTPPPFQGYPPGNTYREATPPKDTPPASTPSPQEKQEGSSNSE
 GEYYESGESLKRLQMALHRTGMITEEKLQCPVCEFSCSVRSQFNEHLLSHETKC
 SMCDFSGETSEKLRHMRNVHDCDDDSSWGEEELNTPKVNSQGKVKTFRCKQ
 CEFSAVTKLEFWDHSRTHIKQERLLTCPKCPFVTEYKHHLEYHLRNHFGSKPFKC
 DKCSYSCVNKSMNLNSHLKSHSNYQFRCADCTYATKYCHSLKLHLRKYAHNPAM
 10 VLNPDGSPNPLPIVDVYGTRRGPKQKPKNEQQPQQPPQVPTIFNPYSLLPTQMP
 YYNILNGFGGFPPQDVNMEEKNNNVEKEEIREDKAPLDLSCPEPMVEDSNQEA
 PVKNRRKGKAFKLDRIALRLQQQVEVEEQPEPPKPIPPPVVSEPAKSPEIKSCEA
 DSEQQKVEKTEQENVYSCTFCDILFKDIVMYTMHMGYHGYEDPFKCNMCGQQT
 TDKVSFFLHIARTSHS

15 SEQ ID NO:4 muestra la secuencia de nucleótidos de un promotor fago T7.

SEQ ID NO:5 muestra un ejemplo de ADN que codifica un gen *YFPv2* que se dirige a un ARN formador de ARN de horquilla; que contiene polinucleótido de sentido *YFPv2*, un polinucleótido de bucle
 20 que incluye un intrón ST-LS1 (subrayado), y polinucleótido antisentido *YFPv2* (negrita):

ATGTCATCTGGAGCACTTCTCTTTTCATGGGAAGATTCCTTACGTTGTGGAGAT
 GGAAGGGAATGTTGATGGCCACACCTTTAGCATACGTGGGAAAGGCTACGGA
 GATGCCTCAGTGGGAAAGGACTAGTACCGGTTGGGAAAGGTATGTTTCTGCT
 25 TCTACCTTTGATATATATATAATAATTATCACTAATTAGTAGTAATATAGTATTT

CAAGTATTTTTTTTCAAATAAAAAGAATGTAGTATATAGCTATTGCTTTTCTGTAG
TTTATAAGTGTGTATATTTTAATTTATAACTTTTCTAATATATGACCAAACATG
GTGATGTGCAGGTTGATCCGCGGTTA**CTTTCCCACTGAGGCATCTCCGTAGC**
CTTTCCCACGTATGCTAAAGGTGTGGCCATCAACATTCCCTTCCATCTCCAC
5 **AACGTAAGGAATCTTCCCATGAAAGAGAAGTGCTCCAGATGACAT**

SEQ ID NO:6 muestra un ejemplo de ADN que comprende un intrón ST-LS1.

SEQ ID NO:7 y 8 muestran cebadores utilizados para amplificación por PCR de un polinucleótido de *BSB_hb*.

10 SEQ ID NO:9 muestra el patrón de ADN para la hebra de sentido de un ejemplo de ARNdH de *YFPv2*.

SEQ ID NO:10 y 11 muestran cebadores utilizados para amplificación por PCR de un gen *YFP*.

15 SEQ ID NO:12 y 13 muestran ARNs ejemplares transcritos a partir de ácidos nucleicos que comprenden ejemplos de polinucleótidos de *hunchback* y fragmentos de los mismos.

SEQ ID NO:14 muestra un ORF actina.

TACAAAATGTGTGACGAAGAAGTTGCTGCTTTAGTTGTAGACAATGGATCTGG
TATGTGCAAAGCCGGTTTCGCTGGAGATGATGCACCCCGAGCTGTATTCCCA
20 TCAATTGTTGGCAGGCCTAGACACCAGGGTGTTCATGGTTGGAATGGGACAAA
AGGACAGTTATGTTGGAGACGAAGCCCAAAGCAAGAGAGGTATCCTCACCT
GAAATACCCCATTTGAACACGGTATCATCACCAACTGGGACGACATGGAAAAG
ATCTGGCATCACACCTTCTACAACGAGCTGCGAGTCGCTCCAGAGGAACACC
CCATCCTCCTGACTGAGGCTCCCCTCAACCCCAAAGCCAACAGGGAGAAGAT
25 GACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCGAGCCATGTATGTCGCCATC

CAGGCTGTA CTCTCCCTCTATGCCTCCGGTCGTA CTACCGGTATTGTA CTCTGA
 CTCAGGAGATGGTGTCTCCCACACCGTACCCATCTATGAAGGTTATGCCCTT
 CCCACGCCATCCTCCGTCTGGATCTTGCTGGACGTGACTTGACTGACTATC
 TTATGAAGATCCTCACCGAGCGTGGTTACAGCTTCACCACCACCGCTGAAAG
 5 GGAAATCGTCAGGGACATCAAGGAAAACTGTGCTATGTCGCCCTGGACTTT
 GAGCAGGAAATGGCCACCGCCGCTGCCTCCACCTCCCTGGAGAAGTCCTAT
 GAACTTCCCGACGGTCAGGTCATCACCATCGGTAAACGAGAGGTTCCGTTGCC
 CAGAGGCTCTCTTCCAGCCTTCCTTCTTGGGTATGGAATCTTGCGGTATCCAT
 GAGACTGTCTACA ACTCCATCATGAAGTGCGACGTTGACATCAGGAAGGACT
 10 TGTACGCCAACACCGTCCTCTCCGGAGGTACCACCATGTACCCAGGTATTGC
 TGACAGGATGCAGAAGGAAATCACCGCCCTCGCTCCTTCAACCATCAAGATC
 AAGATCATTGCTCCCCCAGAAAGGAAGTACTCCGTATGGATCGGTGGTTCCA
 TCTTGGCTTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGCAGGAATA
 CGACGAATCCGGCCCAGGCATCGTCCACCGCAAATGCTTC

15

Descripción Detallada de la Invención

I. Descripción general de las diversas modalidades

Desarrollamos la interferencia por ARN (iARN) como una
 herramienta para el manejo de la plaga de hemípteros, utilizando una
 20 de las especies de la plaga objetivo más probable para las plantas
 transgénicas que expresan ARNdh; la chinche marrón de la soya o
 neotropical. Hasta ahora, la mayoría de los genes propuestos como
 objetivos para la iARN en insectos particulares en realidad no logran
 su propósito, y aquellos objetivos útiles que se han identificado
 25 comprenden generalmente a aquellos que son letales en la etapa de

ninfa. En la presente, se describe la inactivación mediada por iARN de *Hunchback* (*hb*) en chinche marrón de la soya, que se conoce por provocar la disrupción del desarrollo embriónico cuando, por ejemplo, iARN son moléculas suministradas vía ARNdh de *hunchback* a hembras adultas. La exposición de insectos hembras adultos a ARNdh de *hunchback* no afectó la longevidad del adulto cuando se administró oralmente. Sin embargo, existe todavía una ausencia casi completa de incubación en los huevos recolectados de hembras expuestas a ARNdh de *hunchback*. En las modalidades de la presente, la capacidad de suministrar ARNdh de *hunchback* mediante la alimentación a insectos adultos confiere un efecto de pARNi que es muy útil en el manejo de plagas de insectos (por ej., hemípteros). Además, el potencial para afectar múltiples secuencias objetivo tanto en plagas de hemípteros ninfas como adultos puede aumentar las oportunidades para desarrollar modalidades sustentables para el manejo de plagas de insectos que comprenden tecnologías de ARNi.

En el presente documento se divulgan métodos y composiciones para el control genético de las infestaciones por plagas de hemípteros. Se proveen también métodos para la identificación de uno o más gen(es) esenciales para el ciclo de vida de una plaga de hemípteros para uso como un gen objetivo para el control mediado por iARN de una población de plaga de hemípteros. Se pueden diseñar vectores de ADN plasmídico que codifican una molécula de ARN para la supresión de uno o más gen(es) objetivos esenciales para el crecimiento, supervivencia, desarrollo y/o

reproducción. En algunas de las modalidades, la molécula de ARN puede estar en capacidad de formar moléculas de ARNdh. En algunas de las modalidades se proveen métodos para la represión post-transcripcional de la expresión o inhibición de un gen objetivo
5 mediante moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una secuencia codificante o no codificante del gen objetivo en una plaga de hemípteros. En estas y otras modalidades adicionales, una plaga puede ingerir una o más moléculas de ARNdh, ARNip, ARNhc, miARN y/o ARNhp transcritas de toda o una porción de una molécula
10 de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia codificante o no codificante de un gen objetivo, proporcionando de este modo un efecto protector a la planta.

Por lo tanto, algunas de las modalidades involucran la inhibición específica de secuencia de la expresión de los productos
15 de gen objetivo, usando ARNdh, ARNip, ARNhc, miARN y/o ARNhp que es complementario a las secuencias codificantes y/o no codificantes del gen objetivo(s) para lograr por lo menos el control parcial de una plaga de hemípteros. Se divulga un conjunto de moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas que comprenden
20 un polinucleótido, por ejemplo, tal como se establece en SEQ ID NO:1, y fragmentos de la mismas En algunas de las modalidades una molécula de ARNdh estabilizada puede ser expresada a partir de estos polinucleótidos, fragmentos de los mismos, o un gen que comprende uno o más de estos polinucleótidos, para el
25 silenciamiento post-transcripcional o inhibición de un gen objetivo.

En ciertas modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas comprenden todo o parte de cualquiera de las SEQ ID NO:1 y 2.

Algunas de las modalidades involucran una célula hospedera recombinate (por ejemplo, una célula de planta) que tiene en su
 5 genoma por lo menos un ADN recombinante que codifica por lo menos una molécula(s) de ARNi (por ejemplo, ARNdh). En modalidades particulares, la molécula(s) de ARNdh puede ser producida cuando es ingerida por una plaga de hemípteros para el
 10 silenciamiento post-transcripcional o inhibición de la expresión de un gen objetivo en la plaga o progenie de la plaga. El ADN recombinante puede comprender, por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NO:1 y 2 , fragmentos de cualquiera de las SEQ ID NO:1 y 2, y un polinucleótido que consiste en una secuencia parcial de un gen que
 15 comprende una de las SEQ ID NO: 1 y 2; y/o complementos de las mismas.

Algunas de las modalidades comprenden una célula hospedera recombinate que tiene en su genoma un ADN recombinante que codifica por lo menos una molécula(s) de ARNi (por ejemplo, ARNdh)
 20 que comprende todo o parte de un ARN codificado por la SEQ ID NO:12 (por ejemplo, SEQ ID NO:12 y/o SEQ ID NO: 13). Cuando es ingerida por una plaga de hemípteros, la molécula(s) de ARNi puede silenciar o inhibir la expresión de un gen de *Hunchback* objetivo (por ejemplo, un ADN que comprende todo o parte de un polinucleótido
 25 seleccionado del grupo que consiste de las SEQ ID NO:1 y 2) en la

plaga o progenie de la plaga, y de este modo resulta en el cese de la reproducción de la plaga, y/o crecimiento desarrollo, y/o alimentación en la progenie de la plaga.

En otras modalidades una célula hospedera recombinante que
5 tiene en su genoma por lo menos un ADN recombinante que codifica por lo menos una molécula de ARN con capacidad de formar una molécula de ARNdh puede ser una célula de planta transformada. Algunas de las modalidades involucran plantas transgénicas que comprenden dicha célula de planta transformada. Además de dichas
10 plantas transgénicas, plantas progenie de cualquier generación de plantas transgénicas, semillas transgénicas, y productos de plantas transgénicas, fueron todos suministrados, cada uno de los cuales comprende ADN recombinante(s). En modalidades particulares, una molécula de ARN con capacidad de formar una molécula de ARNdh
15 puede ser expresada en una célula de planta transgénica. Por lo tanto, en estas y otras modalidades, una molécula de ARNdh puede ser aislada de una célula de planta transgénica. En modalidades particulares, la planta transgénica es una planta que se selecciona del grupo que comprende maíz (*Zea mays*), soya (*Glycine max*), y
20 plantas de la familia *Poaceae*.

Algunas de las modalidades involucran un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de la plaga de hemípteros. En estas y otras modalidades, se puede proveer una molécula de ácido nucleico, en donde la molécula de ácido nucleico
25 comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ARN con

capacidad de formar una molécula de ARNdh. En modalidades particulares, un polinucleótido que codifica una molécula de ARN con capacidad de formar una molécula de ARNdh puede ser operativamente enlazado a un promotor, y puede también ser operativamente enlazado a una secuencia de terminación de la transcripción. En modalidades particulares, un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula de la plaga de hemípteros puede comprender: (a) transformar una célula de planta con un vector que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ARN con capacidad de formar una molécula de ARNdh; (b) cultivar la célula de planta transformada en condiciones suficientes que permiten el desarrollo de un cultivo de célula de la planta que comprende una pluralidad de células de las plantas transformadas; (c) seleccionar una célula de planta transformada que tiene integrado el vector en su genoma; y (d) determinar que la célula de planta transformada seleccionada comprende la molécula de ARN con capacidad de formar una molécula de ARNdh codificada por el polinucleótido del vector. Una planta puede ser regenerada a partir de una célula de planta que tiene el vector integrado en su genoma y comprende la molécula de ARNdh codificada por el polinucleótido del vector.

Por consiguiente, también se divulga una planta transgénica que comprende un vector que tiene un polinucleótido que codifica una molécula de ARN con capacidad de formar una molécula de ARNdh integrada en su genoma, en donde la planta transgénica

comprende la molécula de ARNdh codificada por el polinucleótido del vector. En modalidades particulares, la expresión de una molécula de ARN con capacidad de formar una molécula de ARNdh en la planta es suficiente para modular la expresión de un gen objetivo en una

5 célula de una plaga de hemípteros que entra en contacto con la célula de planta o planta transformada (por ejemplo, alimentándose en la planta transformada, una parte de la planta (por ejemplo, hojas o célula de la planta), o en una célula de una progenie de la plaga de hemípteros que se pone en contacto con la planga o célula de planta

10 transformada (por ejemplo, por transmisión parental), de manera que se inhibe la reproducción de la plaga. Las plantas transgénicas que se divulgan en el presente documento pueden presentar resistencia y/o tolerancia mejorada a las infestaciones de plagas de hemípteros. Las plantas transgénicas particulares pueden mostrar resistencia y/o

15 protección mejorada a una o más plaga(s) que se seleccionan del grupo que consiste de: *Piezodorus guildinii*; *Halyomorpha halys*; *Nezara viridula*; *Acrosternum hilare*; *Euschistus heros*; *Euschistus servus*, *Chinavia hilare*; *C. marginatum*; *Dichelops melacanthus*; *D. furcatus*; *Edessa meditabunda*; *Thyanta perditor*; *Horcias nobilellus*;

20 *Taedia stigmosa*; *Dysdercus peruvianus*; *Neomegalotomus parvus*; *Leptoglossus zonatus*; *Niesthrea sidae*; *Lygus hesperus*; and *L. lineolaris*.

También en el presente documento se divulgan métodos para la liberación de agentes de control, tal como una molécula de ARNi,

25 a una plaga de hemípteros. Tales agentes de control pueden causar,

de manera directa o indirecta, un deterioro en la capacidad de una población de una plaga de hemípteros de alimentarse, crecer o de otra forma causar daño en un hospedero. En algunas de las modalidades se provee un método que comprende la liberación de una molécula estabilizada de ARNdh a una plaga de hemípteros a fin de suprimir por lo menos un gen objetivo en la plaga o su progenie, produciendo de este modo iARN parental y reduciendo o eliminando el daño a la planta en un huésped de la plaga. En algunas de las modalidades un método para inhibir la expresión de un gen objetivo en la plaga de hemípteros puede resultar en el cese de la reproducción de la plaga, y/o crecimiento, desarrollo, y/o alimentación en la progenie de la plaga. En algunas modalidades, el método puede significativamente reducir el tamaño de una generación de plagas subsiguiente en una infestación, sin resultar directamente en mortalidad de la plaga que está en contacto con la molécula iARN. En algunas modalidades, el método puede significativamente reducir el tamaño de una generación de plagas subsiguiente en una infestación, mientras que también produce la mortalidad de las plagas que están en contacto con la molécula iARN.

En algunas de las modalidades se proveen composiciones (por ejemplo, una composición tópica) que comprenden una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh) para su uso con las plantas, animales, y/o el medio ambiente de una planta o animal para lograr la eliminación o reducción de una infestación de plaga de hemípteros.

En modalidades particulares, la composición puede ser una composición nutricional o fuente alimenticia para ser alimentada a la plaga de hemípteros. Algunas de las modalidades comprenden la elaboración de la composición nutricional o fuente alimenticia disponible para la plaga. La ingestión de una composición que comprende moléculas de ARNi puede resultar en la absorción de las moléculas por parte de una o más células de la plaga de hemípteros, lo cual a su vez puede resultar en la inhibición de la expresión de por lo menos un gen objetivo en la célula(s) de la plaga o su progenie. La ingestión de o el daño a una planta o célula de planta por parte de una infestación de plaga de hemípteros puede ser limitada o eliminada en o sobre cualquier tejido hospedero o medio ambiente en el cual la plaga está presente proporcionando una o más composiciones que comprenden una molécula de ARNi en el hospedero de la plaga.

Las composiciones y métodos que se divulgan en el presente documento se pueden utilizar juntos en combinaciones con otros métodos y composiciones para controlar el daño ocasionado por las plagas de hemípteros. Por ejemplo, una molécula de ARNi tal como se describe en el presente documento para la protección de las plantas contra las plagas de hemípteros puede ser utilizada en un método que comprende el uso adicional de uno o más agentes químicos efectivos contra una plaga de hemípteros, biopesticidas efectivos contra dicha plaga de hemípteros, rotación del cultivo, técnicas genéticas recombinantes que exhiben características

diferentes de las características de los métodos mediados por iARN y composiciones de iARN (por ejemplo, producción recombinante de proteínas en plantas que son dañinas para una plaga de hemípteros (por ejemplo, toxinas Bt)), y/o la expresión recombinante de moléculas de iARN no parentales (por ejemplo moléculas iARN letales que resulta en la interrupción de crecimiento, desarrollo y/o alimentación en la plaga de hemípteros que ingiere la molécula de iARN):

II. Abreviaturas

10	BSB	Chinche Marrón de la soya o del Neotrópico (<i>Euschistus heros</i>)
	ARNdh	ácido ribonucleico de doble hebra
	GI	inhibición del crecimiento
	NCBI	National Center for Biotechnology Information
15	ADNg	ADN genómico
	ARNi	ácido ribonucleico inhibidor
	ORF	marco de lectura abierto
	iARN	interferencia por ácido ribonucleico
	miARN	micro ácido ribonucleico
20	ARNip	ácido ribonucleico inhibidor pequeño
	ARNhp	ácido ribonucleico de horquilla
	ARNhc	ácido ribonucleico de horquilla corta
	pIARN	interferencia de ARN parental
	UTR	región no traducida
25	PCR	Reacción en cadena de polimerasa

	pPCR	reacción en cadena de polimerasa cuantitativa
	RISC	Complejo silenciador inducido por ARN
	RH	humedad relativa
	SEM	error estándar de la media
5	YFP	proteína fluorescente amarilla

III. Términos

En la descripción y tablas a continuación, se utilizan una cantidad de términos. Con el fin de proporcionar un entendimiento claro y consistente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, 10 incluyendo el alcance que se le dará a dichos términos, se proveen las siguientes definiciones:

Poner en contacto (con un organismo): Tal como se utiliza en el presente documento, el término “contacto con” o “absorción por” un organismo (por ejemplo, una plaga de hemípteros), con relación a 15 una molécula de ácido nucleico, incluye la internalización de la molécula de ácido nucleico en el organismo, por ejemplo y sin limitación: ingestión de la molécula por parte del organismo (por ejemplo, mediante alimentación); puesta en contacto del organismo con una composición que comprende la molécula de ácido nucleico; y 20 la inmersión de los organismos con una solución que comprende la molécula de ácido nucleico.

Cóntigo: Tal como se utiliza en el presente documento el término “cóntigo” se refiere a una secuencia de ADN que es reconstruida de un conjunto de segmentos de ADN superpuestos que 25 se derivan de una única fuente genética.

Planta de maíz: Tal como se utiliza en el presente documento, el término “planta de maíz” se refiere a una planta de las especies, *Zea mays* (maíz dulce).

Expresión: Tal como se utiliza en el presente documento, la “expresión” de un polinucleótido codificante (por ejemplo, un gen o un transgen) se refiere al proceso por medio del cual la información codificada de una unidad transcripcional de ácido nucleico (incluyendo, por ejemplo, ADNg o ADNc) es convertida en una parte operacional, no operacional o estructural de una célula, a menudo incluyendo la síntesis de una proteína. La expresión génica puede ser influenciada por señales externas; por ejemplo, exposición de una célula, tejido u organismo a un agente que incrementa o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen puede también ser regulada en cualquier punto en la trayectoria desde el ADN al ARN a la proteína. La regulación de la expresión génica se produce, por ejemplo, a través de controles que actúan en la transcripción, traducción, transporte y procesamiento del ARN, degradación de las moléculas intermediarias tal como ARNm, o a través de la activación, inactivación, compartimentación o degradación de las moléculas específicas de proteína después de que ellas han sido elaboradas, o mediante las combinaciones de los mismos. La expresión génica puede ser medida en el nivel del ARN o el nivel de la proteína por medio de cualquier método conocido en el arte, incluyendo, sin limitación, técnica Northern blot, RT-PCR, técnica Western blot, o ensayo(s) de la actividad de las proteínas *in*

vitro, in situ o in vivo.

Material genético: Tal como se utiliza en el presente documento, el término “material genético” incluye todos los genes y moléculas de ácido nucleico, tales como ADN y ARN.

5 Plaga de hemípteros: Tal como se utiliza en el presente documento, el término “plaga de hemípteros” se refiere a los insectos del orden Hemiptera, incluyendo, por ejemplo y sin limitación, insectos en las familias Pentatomidae, Miridae, Pyrrhocoridae, Coreidae, Alydidae, y Rhopalidae, que se alimentan en un amplio
10 rango de plantas huéspedes y tienen partes de la boca que perforan y succionan. En ejemplos particulares, una plaga de hemípteros se selecciona de la lista que comprende, *Euschistus heros* (Fabr.) (Chinche Marrón del Neotrópico), *Nezara viridula* (L.) (Chinche Verde del Sur), *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Chinche Verde Pequeña),
15 *Halyomorpha halys* (Stål) (Chinche marrón marmórea), *Chinavia hilare* (Say) (Chinche Verde), *Euschistus servus* (Say) (Chinche Marrón), *Dichelops melacanthus* (Dallas), *Dichelops furcatus* (F.), *Edessa meditabunda* (F.), *Thyanta perditor* (F.) (Chinche de hombros rojos del neotrópico), *Chinavia marginatum* (Palisot de Beauvois),
20 *Horcias nobilellus* (Berg) (Chinche de algodón), *Taedia stigmosa* (Berg), *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Ménéville), *Neomegalotomus parvus* (Westwood), *Leptoglossus zonatus* (Dallas), *Niesthrea sidae* (F.), *Lygus hesperus* (Knight) (Chinche opaca de las plantas del oeste), y *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois).

25 Inhibición: Tal como se utiliza en el presente documento, el

término “inhibición”, cuando se utiliza para describir un efecto en un polinucleótido codificante (por ejemplo, un gen), se refiere a una disminución medible en el nivel celular del ARNm transcrito del polinucleótido codificante y/o péptido, polipéptido o proteína producto del polinucleótido codificante. En algunos de los ejemplos, la expresión de un polinucleótido codificante puede ser inhibida de modo que la expresión es aproximadamente eliminada. “Inhibición específica” se refiere a la inhibición de un polinucleótido codificante objetivo sin afectar por consiguiente la expresión de otros polinucleótidos codificantes (por ejemplo, genes) en la célula en donde la inhibición específica se está llevando a cabo.

Aislado: Un componente biológico “aislado” (tal como un ácido nucleico o proteína) ha sido sustancialmente separado, producido separado o purificado separado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en la cual el componente está presente de manera natural (es decir, otros ADN y ARN cromosómicos y extra-cromosómicos, así como proteínas), mientras se efectúa un cambio químico o puede ser aislado de un cromosoma rompiendo los enlaces químicos que conectan el ácido nucleico al ADN restante en el cromosoma). Las moléculas de ácido nucleico y las proteínas que han sido “aisladas” incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas por medio de métodos de purificación estándares. El término también abarca los ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante la expresión recombinante en una célula hospedera, así como también moléculas químicamente sintetizadas de ácido

nucleico, proteínas y péptidos.

Molécula de ácido nucleico: Tal como se utiliza en el presente documento, el término “molécula de ácido nucleico” puede hacer referencia a una forma polimérica de nucleótidos, que puede incluir
5 tanto hebras homosentido como antisentido de ARN, ADNc, ADNg, y formas sintéticas y polímeros mixtos de los antes mencionados. Un nucleótido o nucleobase puede hacer referencia a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una “molécula de ácido nucleico”, tal como se utiliza en
10 el presente documento, es sinónimo de “ácido nucleico” y “polinucleótido”. Una molécula de ácido nucleico es usualmente por lo menos de 10 bases en longitud, a menos que se indique de manera específica lo contrario. Por costumbre, la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico se lee desde el
15 extremo 5' al 3' de la molécula. El “complemento” de una molécula de ácido nucleico se refiere a un polinucleótido que tiene nucleobases que pueden formar pares de bases con las nucleobases de la molécula de ácido nucleico (es decir, A-T/U, y G-C).

Algunas de las modalidades incluyen ácidos nucleicos que
20 comprenden una plantilla de ADN que es transcrita en una molécula de ARN que es el complemento de una molécula de ARNm. En estas modalidades, el complemento del ácido nucleico transcrito en la molécula de ARNm está presente en la orientación 5' a 3', de manera que la ARN polimerasa (que transcribe el ADN en la dirección 5' a 3')
25 transcribirá un ácido nucleico desde el complemento que puede

hibridar a la molécula de ARNm. A menos que se indique explícitamente lo contrario, o sea evidente que es lo contrario a partir del contexto, el término “complemento”, por lo tanto, se refiere a un polinucleótido que tiene nucleobases, desde 5’ hasta 3’, que
 5 pueden formar pares de bases con las nucleobases de un ácido nucleico de referencia. De manera similar, a menos que se indique explícitamente que es de otra forma (o sea evidente que es de otra forma a partir del contexto), el “complemento inverso” de un ácido nucleico se refiere al complemento en la orientación inversa. Lo
 10 anteriormente mencionado se demuestra” en la ilustración a continuación:

ATGATGATG	polinucleótido
TACTACTAC	“complemento” del polinucleótido
CATCATCAT	“complemento inverso” del polinucleótido

15 Algunas de las modalidades de la invención incluyen moléculas de ARNi formadoras de ARN horquillado. En estas moléculas de ARNi, tanto el complemento de un ácido nucleico a ser seleccionado por interferencia por ARN como el complemento inverso se pueden encontrar en la misma molécula, de modo que la molécula de ARN de
 20 una sola hebra puede “plegarse” e hibridarse en sí misma sobre la región que comprende los polinucleótidos complementario y complementario inverso.

Las “moléculas de ácido nucleico” incluyen todos los polinucleótidos, por ejemplo: formas de ADN de una sola y doble
 25 hebra; formas de ARN de una sola hebra; y formas de ARN de doble

hebra (ARNdh). El término “secuencia de nucleótidos” o “secuencia de ácido nucleico” se refiere a ambas hebras homosentido y antisentido de un ácido nucleico ya sea hebras únicas individuales o en el dúplex. El término “ácido ribonucleico” (ARN) es inclusivo de

5 ARNi (ARN inhibidor), ARNdh (ARN de doble hebra), ARNip (ARN interferente pequeño), ARNhc (ARN de horquilla corta), ARNm (ARN mensajero), miARN (micro ARN), , ARNhp (ARN de horquilla), ARNt (ARN de transferencia, ya sea cargado o descargado con un correspondiente aminoácido acilado), y ARNc (ARN complementario).

10 El término “ácido desoxirribonucleico” (ADN) es inclusivo de ADNc, ADNg, y de los híbridos de ADN-ARN. Los términos “polinucleótido”, “ácido nucleico”, “segmentos” de los mismos, y “fragmentos” de los mismos serán entendidos por aquellas personas en el arte que incluyen, por ejemplo, ADNg; ARN ribosómicos; ARN de

15 transferencia; ARN mensajeros; operones, y polinucleótidos manipulados genéticamente más pequeños que codifican o pueden ser adaptados para que codifiquen péptidos, polipéptidos o proteínas.

Oligonucleótido: Un oligonucleótido es un polímero de ácido

20 nucleico corto. Los oligonucleótidos se pueden formar por escisión de segmentos más grandes de ácido nucleico, o mediante polimerización de los precursores de nucleótido individuales. Los sintetizadores automatizados permiten la síntesis de oligonucleótidos hasta varios cientos de bases en longitud. Debido a que los

25 oligonucleótidos pueden enlazarse a un ácido nucleico

complementario, ellos pueden ser utilizados como sondas para la detección de ADN o ARN. Los oligonucleótidos compuestos de ADN (oligodesoxirribonucleótidos) se pueden utilizar en la PCR, una técnica para la amplificación de secuencias de ADN (transcrito
5 inverso en un ADNc). En la PCR, el oligonucleótido es por lo general referido como un “cebador”, el cual permite que una ADN polimerasa extienda el oligonucleótido y replique la hebra complementaria.

Una molécula de ácido nucleico puede incluir cualquiera o ambos nucleótidos presentes de manera natural y modificados
10 enlazados juntos por medio de enlaces de nucleótidos presentes de manera natural y/o presentes de manera no natural. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser modificadas química o bioquímicamente, o pueden contener bases nucleótidas no naturales o derivatizadas, tal como será rápidamente apreciado por aquellas
15 personas expertas en el arte. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos presentes de manera natural con un análogo, modificaciones internucleótidos (por ejemplo, enlaces no cargados: por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, *etc.*; enlaces cargados: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, *etc.*; fracciones pendientes: por ejemplo, péptidos; intercaladores: por ejemplo, acridina, psoraleno, *etc.*; quelantes; alquilantes; así como enlaces modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, *etc.*). El término “molécula de ácido
20 nucleico” también incluye cualquier conformación topológica,
25

incluyendo las conformaciones de una sola hebra, de doble hebra, parcialmente bicatenario, tricatenario, en horquilla, circular, y en candado.

Tal como se utiliza en el presente documento con relación al ADN, el término “polinucleótido codificante”, “polinucleótido estructural” o “molécula estructural de ácido nucleico” se refiere a un polinucleótido que es finalmente traducido en un polipéptido, mediante transcripción y ARNm, cuando es colocado bajo el control de los elementos regulatorios apropiados. Con respecto al ARN, el término “polinucleótido codificante” se refiere a un polinucleótido que es traducido en un péptido, polipéptido o proteína. Los límites de un polinucleótido codificante están determinados por un codón de iniciación de traducción en el terminal 5' y un codón de terminación de traducción en el terminal 3'. Los polinucleótidos codificantes incluyen, pero sin estar limitados a: ADNg; ADNc; EST; así como polinucleótidos recombinantes.

Tal como se utiliza en el presente documento, “polinucleótido no codificante transcrito” se refiere a segmentos de moléculas de ARNm tal como 5'UTR, 3'UTR y segmentos de intrón que no son traducidos en un péptido, polipéptido o proteína. Además, “polinucleótido no codificante transcrito” se refiere a un ácido nucleico que es transcrito en un ARN que funciona en la célula, por ejemplo, ARN estructurales (por ejemplo, ARN ribosómico (ARNr) tal como es ejemplificado por el ARNr 5S, ARNr 5.8S, ARNr 16S, ARNr 18S, ARNr 23S, y ARNr 28S, y similares); ARN de transferencia

(ARNt); y ARNnp tal como U4, U5, U6, y similares. Los polinucleótidos no codificantes transcritos también incluyen, por ejemplo y sin limitación, ARN pequeños (ARNp), cuyo término es a menudo utilizado para describir los ARN no codificantes bacterianos pequeños; ARN nucleolares pequeños (ARNnop); microARN; ARN interferentes pequeños (ARNip); ARN asociados a piwi (ARNpi); y ARN no codificantes largos. Es más, “polinucleótido no codificante transcrito” se refiere a un polinucleótido que puede existir en forma nativa como un “espaciador” intragénico en un ácido nucleico y que es transcrito en una molécula de ARN.

Interferencia letal por ARN: Tal como se utiliza en el presente documento, el término “interferencia letal por ARN” se refiere a la interferencia por ARN que resulta en la eliminación o en una reducción en la viabilidad del sujeto / individuo al cual se le aplica, por ejemplo, un ARNd_h, miARN, ARNi_p, y/o ARN_hp.

Interferencia Parental por ARN: Tal como se utiliza en la presente, el término “interferencia parental por ARN” (pIARN) se refiere a un fenotipo de interferencia de ARN que se observa en la progenie del sujeto (por ejemplo, una plaga de hemípteros) al cual, por ejemplo, se suministra un ARNd_h, miARN, ARNi_p, ARN_hc, y/o hpARN. En algunas modalidades, pARNi comprende el suministro de un dsARN a una plaga de hemípteros, en donde la plaga es de esa forma menos capaz de reproducirse en forma viable. Un ácido nucleico que inicia pARNi puede o no aumentar la incidencia de mortalidad en una población en la que se suministra el ácido

nucleico. En ciertos ejemplos, el ácido nucleico que inicia pARNi no aumenta la incidencia de mortalidad en la población en la que se suministra el ácido nucleico. Por ejemplo, una población de hemípteros puede alimentarse con uno o más ácidos nucleicos que inician pARNi, en donde las plagas sobreviven y se aparean pero producen huevos que son menos capaces de incubar progenie viable que los huevos producidos por plagas de la misma especie que no se alimentan con ácidos nucleicos. En un mecanismo de pARNi, el ARNi parental suministrado a una hembra es capaz de inactivación de expresión de gen cigótico en embriones de hembra. Bucher *et al.* (2002) Curr. Biol. 12(3):R85-6.

Genoma: Tal como se utiliza en el presente documento, el término “genoma” se refiere a ADN cromosómico que se encuentra dentro del núcleo de una célula, y también se refiere a ADN organelo que se encuentra dentro de los componentes subcelulares de la célula. En algunas de las modalidades de la invención, una molécula de ADN puede ser introducida en una célula de planta, de manera que la molécula de ADN es integrada en el genoma de la célula de planta. En estas y otras modalidades adicionales, la molécula de ADN puede ser ya sea integrada en el ADN nuclear de la célula de planta o integrada en el ADN del cloroplasto o mitocondria de la célula de planta. El término “genoma”, tal y como se aplica a las bacterias, se refiere tanto al cromosoma como a los plásmidos dentro de la célula bacteriana. En algunas de las modalidades de la invención, una molécula de ADN puede ser introducida en una

bacteria de manera que la molécula de ADN es integrada en el genoma de la bacteria. En estas y otras modalidades adicionales, la molécula de ADN puede estar ya sea integrada a los cromosomas o localizada como o en un plásmido estable.

5 Identidad de la secuencia: El término “identidad de la secuencia” o “identidad”, tal como se utiliza en el presente documento, en el contexto de dos polinucleótidos o polipéptidos, se refiere a los residuos en las secuencias de las dos moléculas que son las mismas cuando están alineadas para correspondencia
10 máxima a través de una ventana de comparación específica.

 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “porcentaje de identidad de la secuencia” puede hacer referencia al valor determinado mediante la comparación de dos secuencias alineadas de manera óptima (por ejemplo, secuencias de ácido
15 nucleico o secuencias de polipéptidos) de una molécula a través de una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones ni supresiones) para la
20 alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje es calculado determinando el número de posiciones en las cuales el residuo de nucleótido o aminoácido idéntico se produce en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el
25 número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el

resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de la secuencia. Una secuencia que es idéntica en cada posición en comparación con una secuencia de referencia se dice que es 100% idéntica a la secuencia de referencia, y viceversa.

5 Los métodos de alineación de las secuencias para comparación son muy conocidos en la técnica. Diversos programas y algoritmos de alineación se describen, por ejemplo, en: Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 85:2444; Higgins y Sharp (1988) *Gene* 73:237-44; Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-3; Corpet *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang *et al.* (1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65; Pearson *et al.* (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-31; Tatiana *et al.* (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50. Una consideración
10 detallada de los métodos de alineación de secuencias y cálculos de homología se puede encontrar, por ejemplo, en Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

La herramienta de alineamiento *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST® Altschul *et al.* (1990)) del National Center for
20 Biotechnology Information (NCBI); está disponible a partir de diversas fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD), y en la internet, para su uso en conexión con varios programas de análisis de secuencias. Una descripción de cómo determinar la identidad de la secuencia
25 utilizando este programa se encuentra disponible en la internet en la

sección “ayuda” para BLAST®. Para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, se puede utilizar la función “Blast 2 secuencias” del programa BLAST® (Blastn) usando la matriz por omisión BLOSUM62 fijada para los parámetros por omisión. Ácidos nucleicos
5 incluso con mayor similitud de secuencia a las secuencias de los polinucleótidos de referencia mostrarán un porcentaje de identidad creciente cuando son evaluados por medio de este método.

Específicamente hibridizable/ específicamente complementario:
Tal como se utiliza en el presente documento, los términos
10 “específicamente hibridizable” y “específicamente complementario” son términos que indican un grado suficiente de complementariedad de modo que se produce el enlazamiento estable y específico entre la molécula de ácido nucleico y una molécula de ácido nucleico objetivo. La hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico
15 involucra la formación de un alineamiento antiparalelo entre las nucleobases de las dos moléculas de ácido nucleico. Las dos moléculas son luego capaces de formar enlaces de hidrógeno con bases correspondientes en la hebra opuesta para formar una molécula dúplex que, si es suficientemente estable, se puede
20 detectar utilizando métodos muy conocidos en el arte. Un polinucleótido no necesita ser 100% complementario a su ácido nucleico objetivo para que sea específicamente hibridizable. Sin embargo, la cantidad de complementariedad que debe existir para que la hibridación sea específica es una función de las condiciones
25 de hibridación utilizadas.

Las condiciones de hibridación que resultan en grados particulares de severidad variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación escogido así como de la composición y longitud de los ácidos nucleicos de hibridación. Generalmente, la

5 temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{++}) de la solución amortiguadora de hibridación determinarán la severidad de hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen la severidad. Los cálculos con relación a las condiciones de hibridación que se requieren para

10 obtener grados particulares de severidad son conocidos por aquellas personas con conocimientos en el arte, y se discuten, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (ed.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^{da} ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, capítulos 9 y 11; y Hames y Higgins (eds.) Nucleic

15 Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, 1985. Instrucciones y guías más detalladas con respecto a la hibridación de los ácidos nucleicos se pueden encontrar, por ejemplo, en Tijssen, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", en Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-

20 Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2, Elsevier, NY, 1993; y Ausubel *et al.*, Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2, Greene Publishing y Wiley-Interscience, NY, 1995.

Tal como se utiliza en el presente documento, "condiciones

25 severas" abarca las condiciones bajo las cuales la hibridación se

producirá solamente si hay menos de 20% de discrepancia entre la secuencia de la molécula de hibridación y un polinucleótido homólogo dentro de la molécula de ácido nucleico objetivo. “Condiciones severas” incluyen niveles particulares adicionales de

5 severidad. Por consiguiente, tal como se utiliza en el presente documento, condiciones de “severidad moderada” son aquéllas bajo las cuales los polinucleótidos con más de 20% de discrepancia en la secuencia no hibridarán; condiciones de “severidad elevada” son aquéllas bajo las cuales los polinucleótidos con más de 10% de

10 discrepancia no hibridarán; y condiciones de “severidad muy elevada” son aquéllas bajo las cuales los polinucleótidos con más de 5% de discrepancia no hibridarán.

Las siguientes son condiciones representativas no limitativas de hibridación.

15 Condición de severidad elevada (detecta polinucleótidos que comparten por lo menos 90% de identidad de la secuencia): Hibridación en 5x de solución amortiguadora SSC a 65 °C por 16 horas; se lavó dos veces en 2x de solución amortiguadora SSC a temperatura ambiente por 15 minutos cada vez; y se lavó dos veces

20 en 0,5x de solución amortiguadora SSC a 65 °C por 20 minutos cada vez.

Condición de severidad moderada (detecta polinucleótidos que comparten por lo menos 80% de identidad de la secuencia): Hibridación en 5x-6x de solución amortiguadora SSC a 65-70 °C por

25 16 a 20 horas; se lavó dos veces en 2x de solución amortiguadora

SSC a temperatura ambiente por 5 a 20 minutos cada vez; y se lavó dos veces en 1x de solución amortiguadora SSC a 55-70 °C por 30 minutos cada vez.

Condición de control no severa (polinucleótidos que comparten por lo menos 50% de identidad de la secuencia hibridarán):
 Hibridación en 6x de solución amortiguadora SSC a temperatura ambiente hasta 55 °C por 16 a 20 horas; se lavó por lo menos dos veces en 2x-3x de solución amortiguadora SSC a temperatura ambiente hasta 55 °C por 20 a 30 minutos cada vez.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “sustancialmente homólogo” u “homología sustancial”, con relación a un ácido nucleico, se refiere a un polinucleótido que tiene nucleobases contiguas que hibridan bajo condiciones rigurosas al ácido nucleico de referencia. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que son sustancialmente homólogos a un ácido nucleico de referencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1 y 2 son aquellos ácidos nucleicos que hibridan bajo condiciones rigurosas (por ejemplo, las condiciones de severidad moderada establecidas, *supra*) al ácido nucleico de referencia de cualquiera de las SEQ ID NOs:1 y 2. Los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener por lo menos 80% de identidad de secuencia. Por ejemplo, los polinucleótidos sustancialmente homólogos pueden tener desde aproximadamente 80% hasta 100% de identidad de secuencia, tal como 79%; 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
 5 95%; aproximadamente 96%; aproximadamente 97%;
 aproximadamente 98%; aproximadamente 98,5%; aproximadamente
 99%; aproximadamente 99,5% y aproximadamente 100%. La
 propiedad de homología sustancial está estrechamente relacionada
 con la hibridación específica. Por ejemplo, una molécula de ácido
 10 nucleico es específicamente hibridizable cuando hay un grado
 suficiente de complementariedad para evitar el enlazamiento no
 específico del ácido nucleico a los polinucleótidos no objetivo bajo
 condiciones donde se desea el enlazamiento específico, por ejemplo,
 bajo condiciones rigurosas de hibridación.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término
 “ortólogo” se refiere a un gen en dos o más especies que han
 evolucionado de un ácido nucleico común ancestral, y puede retener
 la misma función en las dos o más especies.

Tal como se utiliza en el presente documento, se dice que dos
 20 moléculas de ácido nucleico exhiben “complementariedad completa”
 cuando cada nucleótido de un polinucleótido leído en la dirección 5'
 a 3' es complementario a cada nucleótido del otro polinucleótido
 cuando se lee en la dirección 3' a 5'. Un polinucleótido que es
 complementario a un polinucleótido de referencia exhibirá una
 25 secuencia idéntica al complemento inverso del polinucleótido de

referencia. Estos términos y descripciones están bien definidos en el arte y son fácilmente comprendidos por aquellas personas con conocimientos en el arte.

Enlazado operativamente: Un primer polinucleótido es enlazado
5 operativamente con un segundo polinucleótido cuando el primer polinucleótido está en una relación funcional con el segundo polinucleótido. Cuando los polinucleótidos producidos de una manera recombinante, enlazados de manera operable están generalmente contiguos, y, cuando es necesario se unen dos regiones codificantes
10 de proteínas, en el mismo marco de lectura (por ejemplo, en un ORF fusionado en la traducción). Sin embargo, los ácidos nucleicos no necesitan ser contiguos para estar enlazados de manera operable.

El término, “enlazado operativamente”, cuando se utiliza con referencia a un elemento regulador genético y un polinucleótido
15 codificante, quiere decir que el elemento regulador afecta la expresión del polinucleótido codificante enlazado. “Elementos reguladores” o “elementos de control” se refieren a polinucleótidos que influyen en la sincronización y nivel/ cantidad de transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o la traducción del
20 polinucleótido codificante asociado. Los elementos reguladores pueden incluir promotores; líderes de traducción; intrones; potenciadores; estructuras en horquilla; polinucleótidos de enlazamiento represores; polinucleótidos con una secuencia de terminación; polinucleótidos con una secuencia de reconocimiento de
25 poliadenilación; *etc.* Los elementos reguladores particulares pueden

estar localizados cadena arriba y/o cadena abajo de un polinucleótido codificante enlazado operativamente a los mismos. De igual manera, elementos reguladores particulares operativamente enlazados a un polinucleótido codificante pueden estar localizados
5 en la hebra complementaria asociada de una molécula de doble hebra de ácido nucleico.

Promotor: Tal como se utiliza en el presente documento, el término “promotor” se refiere a una región de ADN que puede estar cadena arriba del inicio de la transcripción, y que puede estar
10 involucrado en el reconocimiento y enlazamiento de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un promotor puede estar operativamente enlazado a un polinucleótido codificante para su expresión en una célula, o un promotor puede estar operativamente enlazado a un polinucleótido que codifica un
15 péptido señal que puede estar operativamente enlazado a un polinucleótido codificante para su expresión en una célula. Un “promotor de planta” puede ser un promotor en capacidad de iniciar la transcripción en las células de plantas. Los ejemplos de promotores bajo control del desarrollo incluyen promotores que
20 preferentemente inician la transcripción en ciertos tejidos, tales como hojas, raíces, semillas, fibras, vasos del xilema, traqueidos o esclerénquima. Dichos promotores son referidos como “preferidos del tejido”. Los promotores que inician la transcripción solamente en ciertos tejidos son referidos como “específicos del tejido”. Un
25 promotor “específico al tipo de célula” principalmente dirige la

expresión en ciertos tipos de células en uno o más órganos, por ejemplo, células vasculares en raíces u hojas. Un promotor “inducible” puede ser un promotor que puede estar bajo control medioambiental. Los ejemplos de condiciones ambientales que
5 pueden iniciar la transcripción mediante promotores inducibles incluyen condiciones anaeróbicas así como la presencia de la luz. Los promotores específicos del tejido, preferidos del tejido, específicos al tipo de célula e inducibles constituyen la clase de promotores “no constitutivos”. Un promotor “constitutivo” es un
10 promotor que puede estar activo bajo la mayoría de condiciones medioambientales o en la mayoría de los tipos de tejidos o células.

Cualquier promotor inducible se puede utilizar en algunas de las modalidades de la invención. Ver Ward *et al.* (1993) Plant Mol. Biol. 22:361-366. Con un promotor inducible, la tasa de transcripción
15 se incrementa en respuesta a un agente inductor. Los promotores inducibles ejemplares incluyen, pero no están limitados a: Promotores del sistema ACEI que reaccionan al cobre; gen *In2* del maíz dulce que reacciona a los protectores contra herbicidas de bencenosulfonamida; represor Tet de Tn10; y el promotor inducible
20 de un gen de hormonas esteroideas, la actividad transcripcional de la cual pueden ser inducida por una hormona glucocorticoesteroide (Sчена *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 88:0421).

Los promotores constitutivos ejemplares incluyen, pero sin estar limitados a: Promotores de los virus de las plantas, tal como el
25 promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV);

promotores de los genes de actina del arroz; promotores de ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 de maíz dulce; y el promotor ALS, fragmento 5' *Xba1/NcoI* al gen estructural *ALS3 Brassica napus* (o un polinucleótido similar a dicho fragmento
 5 *Xba1/NcoI*) (Publicación Internacional PCT No. WO96/30530).

Adicionalmente, se puede utilizar cualquier promotor específico del tejido o preferido del tejido en algunas de las modalidades de la presente invención. Las plantas transformadas con una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido codificante
 10 operativamente enlazado a un promotor específico del tejido pueden producir el producto del polinucleótido codificante exclusiva, o preferentemente, en un tejido específico. Los promotores específicos del tejido o preferidos del tejido ejemplares incluyen, pero sin estar limitados a: Un promotor preferido de semillas, tal como aquel del
 15 gen faseolina; un promotor específico de hojas e inducido por la luz tal como aquel de *cab* o *rubisco*; un promotor específico de antera tal como aquel de *LAT52*; un promotor específico del polen tal como aquel de *Zm13*; y un promotor preferido de microesporas tal como aquel de *apg*.

20 Planta de frijol de soya: Tal como se utiliza en el presente documento, el término “planta de frijol de soya” se refiere a una planta de la especie *Glycine* sp.; por ejemplo, *G. max*.

Transformación: Tal como se utiliza en el presente documento, el término “transformación” o “transducción” se refiere a la
 25 transferencia de una o más molécula(s) de ácido nucleico a una

célula. Una célula es “transformada” por una molécula de ácido nucleico transducida en la célula cuando la molécula de ácido nucleico es establemente replicada por la célula, ya sea mediante la incorporación de la molécula de ácido nucleico en el genoma celular o mediante la replicación episomática. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “transformación” abarca todas las técnicas mediante las cuales una molécula de ácido nucleico puede ser introducida en dicha célula. Los ejemplos incluyen, pero sin estar limitados a: transfección con vectores virales; transformación con vectores de plásmidos; electroporación (Fromm *et al.* (1986) *Nature* 319:791-3); lipofección (Felgner *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 84:7413-7); microinyección (Mueller *et al.* (1978) *Cell* 15:579-85); transferencia mediada por *Agrobacteria* (Fraley *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 80:4803-7); absorción directa del ADN; y bombardeo con microproyectiles (Klein *et al.* (1987) *Nature* 327:70).

Transgen: Un ácido nucleico exógeno. En algunos de los ejemplos, un transgen puede ser un ADN que codifica una o ambas hebra(s) de un ARN con capacidad de formar una molécula de ARNdh que comprende un polinucleótido que es complementario a una molécula de ácido nucleico que se encuentra en una plaga de hemípteros. En ejemplos adicionales, un transgen puede ser un gen (por ejemplo, un gen con tolerancia a los herbicidas, un gen que codifica un compuesto útil desde el punto de vista industrial o farmacéutico, o un gen que codifica un rasgo agrícola deseable). En

estos y otros ejemplos, un transgen puede contener elementos reguladores operativamente enlazados a un polinucleótido codificante del transgen (por ejemplo, un promotor).

5 Vector: Una molécula de ácido nucleico conforme es introducida en una célula, por ejemplo, para producir una célula transformada. Un vector puede incluir elementos genéticos que le permiten replicar en la célula hospedera, tal como un origen de replicación. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin estar limitados a: un plásmido; cósmido; bacteriófago; o virus que lleva
10 ADN exógeno en una célula. Un vector puede también incluir uno o más genes, incluyendo unos que producen moléculas antisentido, y/o genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos que se conocen en el arte. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, causando de este modo que la célula exprese las
15 moléculas de ácido nucleico y/o proteínas codificadas por el vector. Un vector opcionalmente incluye materiales que ayudan a lograr la entrada de la molécula de ácido nucleico en la célula (por ejemplo, un liposoma, recubrimiento de proteína, *etc.*).

Rendimiento: Un rendimiento estabilizado de aproximadamente
20 100% o más con relación al rendimiento de variedades testigo en la misma ubicación del cultivo que crecen al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones. En modalidades particulares, “rendimiento mejorado” o “mejoramiento del rendimiento” quiere decir una variedad cultivada que tiene un rendimiento estabilizado de 105% o
25 más con relación al rendimiento de variedades testigo en la misma

ubicación del cultivo conteniendo densidades significativas de las plagas de hemípteros que son dañinas para dicha cosecha que crece al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones, dichas plagas son el objetivo de las composiciones y métodos del presente documento.

5 A menos que se indique o denote de manera específica, los términos “un”, “una” y “el/la” significan “por lo menos uno/una” tal como se utiliza en el presente documento.

A menos que se explique de manera específica lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente
10 documento tienen el mismo significado como son comúnmente entendidos por aquellas personas con conocimientos en el arte al cual pertenece la presente divulgación. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en, por ejemplo, Lewin's Genes X, Jones & Bartlett Publishers, 2009 (ISBN 10
15 0763766321); Krebs *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Meyers R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Todos los porcentajes están en peso y todas las
20 proporciones de las mezclas de solventes están en volumen a menos que se indique lo contrario. Todas las temperaturas están en grados Celsius.

IV. Moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido para la plaga de hemípteros

A. Descripción general

En el presente documento se describen moléculas de ácido nucleico útiles para el control de las plagas de hemípteros.. Las moléculas de ácido nucleico que se describen incluyen polinucleótidos objetivo (por ejemplo, genes nativos, y polinucleótidos no codificantes), ARNdh, ARNip, ARNhcs, hpARNs, y miARNs. Por ejemplo, en algunas de las modalidades se describen moléculas de ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, y/o ARNhp que pueden ser específicamente complementarias a todo o parte de uno o más ácidos nucleicos nativos en una plaga de hemípteros. En estas y otras modalidades adicionales, el ácido(s) nucleico nativo puede ser uno o más gen(es) objetivo, el producto del cual puede estar, por ejemplo y sin limitación: involucrado en el proceso reproductivo o involucrado en el desarrollo de larvas/ ninfas. Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento, cuando son introducidas en una célula (por ejemplo, a través de transmisión parental) que comprende por lo menos un ácido(s) nucleico nativo al cual las moléculas de ácido nucleico son específicamente complementarias, pueden iniciar el iARN en la célula, y por consiguiente reducir o eliminar la expresión del ácido(s) nucleico nativo. En algunos de los ejemplos, la reducción o eliminación de la expresión de un gen objetivo por una molécula de ácido nucleico específicamente complementaria al mismo puede dar como resultado la reducción o cese de reproducción en la plaga de hemípteros, y/o crecimiento, desarrollo, y/o alimentación en progenie de la plaga. Estos métodos pueden reducir significativamente el tamaño de una

generación de plagas subsiguiente en una infestación, por ejemplo, sin producir directamente la mortalidad de la plaga que entra en contacto con la molécula de iARN.

En algunas de las modalidades se puede seleccionar por lo menos un gen objetivo en una plaga de hemípteros, en donde el gen objetivo comprende un polinucleótido *Hunchback*. En los ejemplos particulares, se selecciona un gen objetivo en una plaga de hemípteros, en donde el gen objetivo comprende un polinucleótido seleccionado de entre las SEQ ID NOs:1 y 2..

En otras modalidades un gen objetivo puede ser una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que puede ser traducido de forma inversa *in silico* a un polipéptido que comprende una secuencia contigua de aminoácidos que es por lo menos aproximadamente 85% idéntica (por ejemplo, por lo menos 84%, 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, aproximadamente 100% o 100% idéntica) a la secuencia de aminoácidos de una proteína producto de un polinucleótido *Hunchback* (es decir, un polipéptido de HUNCHBACK, por ejemplo, SEQ ID NO:3). Un gen objetivo puede ser cualquier ácido nucleico *Hunchback* en una plaga de hemípteros, cuya inhibición post-transcripcional tiene un efecto nocivo sobre la capacidad de plaga de producir progenie viable, por ejemplo, proveer un beneficio protector contra la plaga a una planta. En los ejemplos particulares, un gen objetivo es una molécula de ácido nucleico que

comprende un polinucleótido que puede ser preparado mediante traducción inversa *in silico* a un polipéptido que comprende una secuencia contigua de aminoácidos que es por lo menos aproximadamente 85% idéntica, aproximadamente 90% idéntica, 5 aproximadamente 95% idéntica, aproximadamente 96% idéntica, aproximadamente 97% idéntica, aproximadamente 98% idéntica, aproximadamente 99% idéntica, aproximadamente 100% idéntica o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos que es el producción de traducción *in silico* de la SEQ ID NO:1.

10 En algunas de las modalidades se proveen ADN, cuya expresión resulta en una molécula de ARN que comprende un polinucleótido que es específicamente complementario a todo o parte de una molécula nativa de ARN que es codificada por un polinucleótido codificante en una plaga de hemípteros. En algunas de 15 las modalidades después de la ingestión de la molécula expresada de ARN por parte de una plaga de hemípteros, se puede obtener una regulación a la baja del polinucleótido codificante en las células de la plaga. En modalidades particulares, la disminución de la regulación del polinucleótido codificante en las células de la plaga de 20 hemípteros puede resultar en la reducción o cesación de reproducción y/o proliferación en la plaga, y/o crecimiento, desarrollo, y/o alimentación en progenie de la plaga..

En algunas de las modalidades, los polinucleótidos objetivo incluyen ARN no codificantes transcritos, tal como 5'UTR; 3'UTR; 25 líderes empalmados; intrones; outrones (por ejemplo, 5'UTR RNA

posteriormente modificado en trans-empalme); donatrones (por ejemplo, ARN no codificante necesario para proveer secuencias donadoras para *trans*-empalme); y otro ARN no codificante transcrito de los genes de la plaga de hemípteros objetivo. Dichos
5 polinucleótidos se pueden derivar tanto de los genes monocistrónicos como poli-cistrónicos.

Por consiguiente, también se describen en el presente documento en conexión con algunas de las modalidades moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, y ARNhp) que
10 comprenden por lo menos un polinucleótido que es específicamente complementario a todo o parte de un ácido nucleico objetivo en una plaga de hemípteros. En algunas de las modalidades una molécula de ARNi puede comprender polinucleótido(s) que son complementarios a todo o parte de una pluralidad de ácidos
15 nucleicos objetivo; por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más ácidos nucleicos objetivo. En modalidades particulares, una molécula de ARNi puede ser producida *in vitro*, o *in vivo* por un organismo modificado genéticamente, tal como una planta o bacteria. También se divulgan ADNc que se pueden utilizar para la producción de
20 moléculas de ARNdh, moléculas de ARNip, moléculas de miARN, moléculas de ARNhc, y/o moléculas de ARNhp que son específicamente complementarias a todo o parte de un ácido nucleico objetivo en una plaga de hemípteros. Además se describen constructos de ADN recombinante para uso en el logro de la
25 transformación estable de hospederos objetivo particulares. Los

hospederos objetivos transformados pueden expresar niveles efectivos de moléculas de ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, y/o ARNhp a partir de los constructos de ADN recombinante. Por lo tanto, también se describe un vector de transformación de plantas

5 que comprende por lo menos un polinucleótido operativamente enlazado a un promotor heterólogo funcional en una célula de planta, en donde la expresión del polinucleótido(s) resulta en una molécula de ARN que comprende una hebra de nucleobases contiguas que es específicamente complementaria a todo o parte de un ácido nucleico

10 objetivo en una plaga de hemípteros.

En los ejemplos particulares, las moléculas de ácido nucleico útiles para el control de las plagas de hemípteros pueden incluir: todo o parte de un ácido nucleico nativo aislado de *Euschistus* que comprende un polinucleótido *Hunchback* (por ejemplo, cualquiera de

15 las SEQ ID NOs:1 y 2); los ADN cuando son expresados resultan en una molécula de ARN que comprende un polinucleótido que es específicamente complementario a todo o parte de una molécula nativa de ARN que es codificada por *Hunchback*; moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, y ARNhp) que

20 comprenden por lo menos un polinucleótido que es específicamente complementario a todo o parte de una molécula de ARN codificada por *Hunchback*; ADNc que se puede utilizar para la producción de moléculas de ARNdh, moléculas de ARNip, moléculas de miARN, moléculas de ARNhc, y/o moléculas de ARNhp que son

25 específicamente complementarias a todo o parte de una molécula de

ARN codificada por *Hunchback*; y constructos de ADN recombinante para uso en obtener la transformación estable de objetivos hospederos particulares, en donde un objetivo hospedero transformado comprende una o más de las moléculas de ácido nucleico anteriores.

B. Moléculas de ácido nucleico

La presente invención provee, *inter alia*, moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, y ARNhp) que inhiben la expresión del gen objetivo en una célula, tejido u órgano de una plaga de hemípteros; y moléculas de ADN capaces de ser expresadas como una molécula de ARNi en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen objetivo en una célula, tejido u órgano de una plaga de hemípteros.

Algunas de las modalidades de la invención proveen una molécula aislada de ácido nucleico que comprende por lo menos un (por ejemplo, uno, dos, tres o más) polinucleótido(s) que se seleccionan del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1; el complemento de la SEQ ID NO:1; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:1; un polinucleótido codificador nativo de un organismo hemíptero (por ej., BSB) que comprende SEQ ID NO:1; el complemento de un polinucleótido codificador nativo de un organismo hemíptero que comprende SEQ ID NO:1; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificador nativo de un organismo hemíptero que comprende SEQ ID NO:1; y el complemento de un fragmento de por lo menos 15

nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificador nativo de un organismo hemíptero que comprende SEQ ID NO:1. En modalidades particulares, el contacto con o la absorción por parte de una plaga de hemípteros del polinucleótido aislado inhibe el crecimiento,
5 desarrollo, reproducción y/o alimentación de la plaga.

En algunas de las modalidades, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención puede comprender por lo menos un (por ejemplo, uno, dos, tres o más) polinucleótido(s) que se seleccionan del grupo que consiste de: SEQ ID NO:12; el complemento de SEQ
10 ID NO:12; SEQ ID NO:13; el complemento de SEQ ID NO:13; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13; el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13; un poliribonucleótido nativo transcrito en un organismo hemíptero a
15 partir de un gen que comprende SEQ ID NO:1; el complemento de un poliribonucleótido nativo transcrito en un organismo hemíptero a partir de un gen que comprende SEQ ID NO:1; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un poliribonucleótido nativo transcrito en un organismo hemíptero a partir de un gen que
20 comprende SEQ ID NO:1; y el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un poliribonucleótido nativo transcrito en un organismo hemíptero a partir de un gen que comprende SEQ ID NO:1. En modalidades particulares, el contacto o absorción por una plaga de hemípteros del polinucleótido asilado
25 inhibe el crecimiento, desarrollo, reproducción y/o alimentación de la

plaga.

En ciertas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la presente invención puede comprender por lo menos un (por ejemplo, uno, dos, tres o más) ADN con capacidad de ser expresado como una molécula de ARNi en una célula o microorganismo para inhibir la expresión del gen objetivo en una célula, tejido u órgano de una plaga de hemípteros. Dichos ADN pueden estar operativamente enlazados a un promotor que funciona en una célula que comprende la molécula de ADN para iniciar o potenciar la transcripción del ARN codificado con capacidad de formar una molécula(s) de ARNdh. En una de las modalidades, por lo menos un (por ejemplo, uno, dos, tres o más) ADN puede ser derivado de un polinucleótido seleccionado de la SEQ ID NO:1. Los derivados de la SEQ ID NO:1 incluyen fragmentos de la SEQ ID NO:1. En algunas de las modalidades dicho fragmento puede comprender, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:1, o un complemento del mismo. Por consiguiente, dicho fragmento puede comprender, por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o más nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:1 o un complemento de las mismas. En algunos de los ejemplos, dicho fragmento puede comprender, por ejemplo, por lo menos 19 nucleótidos contiguos (por ejemplo, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos contiguos) de la SEQ ID NO:1, o un complemento de las mismas.

Algunas de las modalidades comprenden introducir moléculas de ARNdh parcial o totalmente estabilizadas en una plaga de hemípteros para inhibir la expresión de un gen objetivo en una célula, tejido u órgano de la plaga de hemípteros. Cuando son expresados como una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh, 5 ARNip, miARN, ARNhc, y ARNhp) y absorbidos por una plaga de hemípteros, los polinucleótidos que comprenden uno o más fragmentos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO:2, y los complementos de los mismos, pueden ocasionar uno o más de la 10 muerte, paro del desarrollo, inhibición del crecimiento, cambio en la proporción de los sexos, reducción en el tamaño de la nidada, cese de la infección y/o cese de la alimentación por parte de una plaga de hemípteros. En los ejemplos particulares, los polinucleótidos que comprenden uno o más fragmentos (por ejemplo, polinucleótidos 15 incluyendo aproximadamente 15 hasta aproximadamente 300 nucleótidos) de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO:2, y los complementos de las mismas ocasionan una reducción en la capacidad de una generación existente de la plaga para producir una generación posterior de la plaga.

20 En ciertas modalidades, las moléculas de ARNdh provistas por la presente invención comprenden polinucleótidos complementarios a un transcrito de un gen objetivo que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO:2, y fragmentos de las mismas, la inhibición de dicho gen objetivo en una plaga de hemípteros resulta 25 en la reducción o remoción de un polipéptido o agente polinucleótido

que es esencial para el crecimiento, desarrollo de la plaga u otra función biológica. Un polinucleótido seleccionado puede exhibir desde aproximadamente 80% hasta aproximadamente 100% de identidad de secuencia para cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO:2, un fragmento contiguo de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO:2,; y/o el complemento de cualquiera de las anteriormente mencionadas. Por ejemplo, un polinucleótido seleccionado puede exhibir 79%; 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 98.5%; aproximadamente 99%; aproximadamente 99.5% o aproximadamente 100% de identidad de secuencia para cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO:2; un fragmento contiguo de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO:2; y el complemento de cualquiera de las anteriormente mencionadas.

En algunas de las modalidades, una molécula de ADN con capacidad de ser expresada como una molécula de ARNi en una célula o microorganismo que inhibe la expresión del gen objetivo puede comprender un único polinucleótido que es específicamente complementario a todo o parte de un polinucleótido nativo que se

encuentra en una o más especies de la plaga de hemípteros objetivo (por ejemplo, una especie de plaga de hemípteros), o la molécula de ADN puede ser construida como una quimera a partir de una pluralidad de dichos polinucleótidos específicamente complementarios.

En otras modalidades, una molécula de ácido nucleico puede comprender un primer y un segundo polinucleótidos separados por un “enlazador”. Un enlazador puede ser una región que comprende cualquier secuencia de nucleótidos que facilita la formación de la estructura secundaria entre el primer y segundo polinucleótidos, en donde éste se desee. En una de las modalidades, el enlazador es parte de un polinucleótido codificante homosentido o antisentido para el ARNm. El enlazador puede de manera alternativa comprender cualquier combinación de nucleótidos u homólogos del mismo que están en capacidad de ser enlazados en forma covalente a una molécula de ácido nucleico. En algunos de los ejemplos, el enlazador puede ser un intrón (por ejemplo, un intrón ST-LS1 o un intrón RTM1).

Por ejemplo, en algunas de las modalidades, la molécula de ADN puede comprender un polinucleótido que codifica una o más moléculas diferentes de ARNi, en donde cada una de las diferentes moléculas de ARNi comprende un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, en donde el primer y segundo polinucleótidos son complementarios uno con otro. El primer y segundo polinucleótidos pueden ser conectados dentro de una molécula de ARN por medio de

un espaciador. El espaciador puede formar parte del primer polinucleótido o el segundo polinucleótido. La expresión de una molécula de ARN que comprende el primer y segundo polinucleótidos puede conducir a la formación de una molécula de ARNdh, mediante

5 apareamiento de las bases intramoleculares específicas del primer y segundo polinucleótidos. El primer polinucleótido o el segundo polinucleótido puede ser sustancialmente idéntico a un polinucleótido nativo (por ejemplo, un gen objetivo o polinucleótido no codificante transcrito) para una plaga de hemípteros, un derivado del mismo o

10 un polinucleótido complementario del mismo.

Las moléculas de ARNdh de ácido nucleico comprenden hebras dobles de ribonucleótidos polimerizados, y pueden incluir modificaciones ya sea al esqueleto de azúcares y fosfato o al nucleósido. Las modificaciones en la estructura del ARN pueden ser

15 adaptadas para permitir la inhibición específica. En una de las modalidades, las moléculas de ARNdh pueden ser modificadas a través de un proceso enzimático ubicuo de manera que se pueden generar las moléculas de ARNip. Este proceso enzimático puede utilizar una enzima RNasa III, tal como DICER en eucariotas, ya sea

20 *in vitro* o *in vivo*. Ver Elbashir *et al.* (2001) Nature 411:494-8; y Hamilton y Baulcombe (1999) Science 286(5441):950-2. DICER o las enzimas RNasa III funcionalmente equivalentes escinden las hebras más largas de las moléculas ARNdh y/o de ARNhp en oligonucleótidos más pequeños (por ejemplo, ARNip), cada uno de

25 los cuales es aproximadamente de 19 a 25 nucleótidos en longitud.

Las moléculas de ARNip producidas por estas enzimas tienen de 2 a 3 nucleótidos protuberantes 3', y extremos 5' fosfato y 3' hidroxilo. Las moléculas de ARNip generadas por las enzimas RNasa III son desenrolladas y separadas en ARN de una sola hebra en la célula.

5 Las moléculas de ARNip luego de manera específica hibridan con el ARN transcrito de un gen objetivo, y ambas moléculas de ARN son posteriormente degradadas por medio de un mecanismo degradante de ARN celular inherente. Este proceso puede resultar en la degradación o remoción efectiva del ARN codificado por el gen

10 objetivo en el organismo objetivo. El resultado es el silenciamiento post-transcripcional del gen elegido como objetivo. En algunas de las modalidades, las moléculas de ARNip producidas por las enzimas endógenas RNasa III de las moléculas heterólogas de ácido nucleico pueden mediar de manera eficiente la regulación a la baja de los

15 genes objetivo en las plagas de hemípteros.

En algunas de las modalidades, una molécula de ácido nucleico puede incluir por lo menos un polinucleótido que no está presente de manera natural que puede ser transcrito en una molécula de ARN de una sola hebra con capacidad de formar una molécula de ARNdh *in*

20 *vivo* a través de hibridación intermolecular. Dichos ARNdh por lo general son de auto-ensamblaje, y pueden ser provistos en la fuente de nutrición de una plaga de hemípteros para lograr la inhibición post-transcripcional de un gen objetivo. En estas y otras modalidades adicionales, una molécula de ácido nucleico de la

25 invención puede comprender dos diferentes polinucleótidos que no

están presentes de manera natural, cada uno de los cuales es específicamente complementario a un gen objetivo diferente en una plaga de hemípteros. Cuando dicha molécula de ácido nucleico es provista como una molécula de ARNdh a, por ejemplo, una plaga de hemípteros, la molécula de ARNdh inhibe la expresión de por lo menos dos genes objetivos diferentes en la plaga.

C. Obtención de moléculas de ácido nucleico

Se puede utilizar una variedad de polinucleótidos en las plagas de hemípteros, como objetivos para el diseño de las moléculas de ácido nucleico, tal como ARNi y moléculas de ADN que codifican el ARNi. La selección de polinucleótidos nativos no es, sin embargo, un proceso sencillo. Solamente una pequeña cantidad de polinucleótidos nativos en una plaga de hemípteros serán objetivos efectivos. Por ejemplo, no se puede predecir con certeza si un polinucleótido nativo particular puede ser efectivamente regulado a la baja por las moléculas de ácido nucleico de la invención, o si la regulación a la baja de un polinucleótido nativo particular tendrá un efecto perjudicial sobre el crecimiento, viabilidad, proliferación y/o reproducción de una plaga de hemípteros. La amplia mayoría de polinucleótidos nativos de la plaga de hemípteros, tal como EST aisladas de los mismos, no tienen un efecto perjudicial en el crecimiento, viabilidad, proliferación y/o reproducción de la plaga. Tampoco se puede predecir cuál de los polinucleótidos nativos que pueden tener un efecto perjudicial en una plaga de hemípteros están en capacidad de ser utilizados en las técnicas recombinantes para la

expresión de las moléculas de ácido nucleico complementarias a dichos polinucleótidos nativos en una planta huésped y proveer el efecto perjudicial en la plaga durante la alimentación sin ocasionar daño a la planta huésped.

5 En modalidades particulares, las moléculas de ácido nucleico de la invención (por ejemplo, moléculas de ARNdh para ser provistas en la planta huésped de una plaga de hemípteros) son seleccionadas para establecer como objetivo el ADNc que codifica proteínas o partes de proteínas esenciales para el desarrollo de la plaga, tal
10 como los polipéptidos involucrados en las trayectorias metabólica o catabólica bioquímica, división celular, reproducción, metabolismo de la energía, desarrollo embrionario, desarrollo de ninfas, regulación transcripcional y lo similar. Tal como se describe en el presente documento, la ingestión de las composiciones por parte de un
15 organismo de la plaga objetivo conteniendo uno o más ARNdh (por ejemplo, o inyección o contacto tópico), por lo menos un segmento del cual es específicamente complementario a por lo menos un segmento sustancialmente idéntico de ARN producido en las células del organismo de la plaga objetivo, puede resultar en falla o
20 reducción de la capacidad de aparearse, realizar ovoposición, o producir progenie viable. Un polinucleótido, ya sea ADN o ARN, derivado de una plaga de hemípteros puede ser usado para construir células de plantas resistentes a la infestación por las plagas. La planta huésped de la plaga de hemípteros (por ejemplo, *Z. mays*, *G.*
25 *max*, y algodón), por ejemplo, puede ser transformada para que

contenga uno o más polinucleótidos derivados de la plaga de hemípteros tal como se proporciona en el presente documento. El polinucleótido transformado en el hospedero puede codificar uno o más ARN que forman en una estructura de ARNdh en las células o fluidos biológicos dentro del hospedero transformado, de este modo haciendo disponible el ARNdh si/cuando la plaga forma una relación nutricional con el hospedero transgénico. Esto puede dar como resultado la supresión de la expresión de uno o más genes en las células de la plaga, y finalmente la muerte o inhibición de su crecimiento o desarrollo.

En algunas de las modalidades un gen es elegido como objetivo que está esencialmente involucrado en el crecimiento y desarrollo de una plaga de hemípteros. Otros genes objetivo para su uso en la presente invención pueden incluir, por ejemplo, aquellos que juegan roles importantes en la viabilidad, movimiento, migración, crecimiento, desarrollo, infectividad de la plaga de hemípteros y establecimiento de los sitios de alimentación. Un gen objetivo puede por lo tanto ser un gen de mantenimiento o un factor de transcripción. De manera adicional, un polinucleótido nativo de la plaga de hemípteros para el uso en la presente invención puede también ser derivado de un gen homólogo (por ejemplo, un ortólogo), de una planta, viral, bacteriano o de insecto, cuya función es conocida por aquellas personas expertas en el arte, y cuyo polinucleótido es específicamente hibridizable con un gen objetivo en el genoma de la plaga de hemípteros objetivo. Los métodos para la

identificación de un homólogo de un gen con una secuencia conocida de nucleótidos mediante hibridación son conocidos por aquellas personas expertas en el arte.

En otras modalidades, la invención provee métodos para la
5 obtención de una molécula de ácido nucleico que comprende un
polinucleótido a fin de producir una molécula de ARNi (por ejemplo,
ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, y ARNhp). Dicha modalidad
comprende: (a) analizar uno o más gen(es) objetivo para su
expresión, función, y clasificación fenotípica al momento de la
10 supresión del gen mediado por ARNdh en una plaga de hemípteros;
(b) explorar una biblioteca de ADNc o ADNg con una sonda que
comprende todo o una porción de un polinucleótido o un homólogo
del mismo de una plaga objetivo que exhibe un fenotipo alterado (por
ejemplo, reducido) en el crecimiento o desarrollo en un análisis de
15 supresión mediado por ARNdh; (c) identificar un clon de ADN que de
manera específica hibrida con la sonda; (d) aislar el clon de ADN
identificado en la etapa (b); (e) determinar la secuencia del
fragmento de ADNc o ADNg que comprende el clon aislado en la
etapa (d), en donde la molécula secuenciada de ácido nucleico
20 comprende todo o una porción sustancial del ARN o un homólogo del
mismo; y (f) sintetizar químicamente todo o una porción sustancial de
un gen, o un ARNip, miARN, ARNhp, ARNm, ARNhc, o ARNdh.

En modalidades adicionales, un método para la obtención de
un fragmento de ácido nucleico que comprende un polinucleótido a
25 fin de producir una porción sustancial de una molécula de ARNi (por

ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, y ARNhp) incluye: (a) sintetizar cebadores de oligonucleótidos primero y segundo específicamente complementarios a una porción de un polinucleótido nativo de una plaga de hemípteros objetivo; y (b) amplificar un inserto de ADNc o ADNg presente en un vector de clonación utilizando los cebadores de oligonucleótidos primero y segundo de la etapa a), en donde la molécula amplificada del ácido nucleico comprende una porción sustancial de una molécula de ARNip, miARN, ARNhp, ARNm, ARNhc, o ARNdh.

Los ácidos nucleicos pueden ser aislados, amplificados o producidos por medio de una cantidad de enfoques. Por ejemplo, una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, y ARNhp) puede ser obtenida mediante amplificación PCR de un polinucleótido objetivo (por ejemplo, un gen objetivo o un polinucleótido no codificante transcrito objetivo) derivado de una biblioteca ADNg o ADNc, o porciones de los mismos. El ADN o ARN pueden ser extraído de un organismo objetivo, y se pueden preparar bibliotecas de ácido nucleico de los mismos usando los métodos conocidos por aquellas personas con conocimientos en el arte. Las bibliotecas de ADNg o ADNc generadas a partir de un organismo objetivo se pueden utilizar para la amplificación PCR y la secuenciación de los genes objetivo. Un producto de PCR confirmado puede ser utilizado como una plantilla para la transcripción *in vitro* a fin de generar ARN homosentido y antisentido con promotores mínimos. De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico

pueden ser sintetizadas por medio de cualquiera de una cantidad 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 modelo 392 o 394, P.E. Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.), usando químicas estándares, tal como química de fosforamidita. Ver, por ejemplo, Beaucage *et al.* (1992) *Tetrahedron*, 48: 2223-2311; las Patentes Estadounidenses Nos. 4,980,460, 4,725,677, 4,415,732, 4,458,066 y 4,973,679. También se pueden utilizar químicas alternativas que resultan en grupos de estructura principal no naturales, tal como fosforotioato, fosforomidato, y similares.

Una molécula de ARN, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, o ARNhp de la presente invención puede ser producida de forma química o enzimática por una persona experta en el arte a través de reacciones manuales o automatizadas, o en una célula *in vivo* que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica la molécula de ARN, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, o ARNhp. El ARN también puede ser producido mediante síntesis orgánica parcial o total, cualquier ribonucleótido modificado puede ser introducido mediante 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, ARN polimerasa T3, ARN polimerasa T7, y ARN polimerasa SP6). Los constructos de expresión útiles para la clonación y

expresión de los polinucleótidos son conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT No. WO97/32016; y las Patentes Estadounidenses Nos. 5,593,874, 5,698,425, 5,712,135, 5,789,214, y 5,804,693. Las moléculas de ARN que son sintetizadas químicamente o mediante síntesis enzimática *in vitro* pueden ser purificadas antes de la introducción en una célula. Por ejemplo, las moléculas de ARN pueden ser purificadas a partir de una mezcla mediante extracción con un solvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía o una combinación de las mismas. De manera alternativa, las moléculas de ARN que son sintetizadas químicamente o mediante síntesis enzimática *in vitro* pueden ser usadas sin o con un mínimo de purificación, por ejemplo, para evitar pérdidas debido al procesamiento de las muestras. Las moléculas de ARN pueden ser secadas para su almacenamiento o disueltas en una solución acuosa. La solución puede contener soluciones amortiguadoras o sales para promover el apareamiento, y/o estabilización de las hebras dúplex de la molécula de ARNdh.

En las modalidades, una molécula de ARNdh se puede formar por una sola hebra de ARN auto-complementario o de dos hebras de ARN complementario. Las moléculas de ARNdh pueden ser sintetizadas ya sea *in vivo* o *in vitro*. Una ARN polimerasa endógena de la célula puede mediar la transcripción de ARN de una o dos hebras *in vivo*, o se puede utilizar ARN polimerasa clonada para mediar la transcripción *in vivo* o *in vitro*. La inhibición post-transcripcional de un gen objetivo en una plaga de hemípteros puede

ser dirigida al hospedero mediante transcripción específica en un órgano, tejido o tipo de célula del hospedero (por ejemplo, usando un promotor específico del tejido); estimulación de una condición del medio ambiente en el hospedero (por ejemplo, mediante el uso de un

5 promotor inducible que reacciona a la infección, estrés, temperatura, y/o inductores químicos); y/o transcripción por ingeniería genética en una etapa de desarrollo o edad del hospedero (por ejemplo, utilizando un promotor específico de la etapa de desarrollo). Las hebras de ARN que forman una molécula de ARNdh, ya sea

10 transcrita *in vitro* o *in vivo*, pueden o no pueden ser poliadeniladas, y pueden o no pueden ser capaces de ser traducidas en un polipéptido por medio de un aparato de traducción de las células.

D. Vectores recombinantes y transformación de célula hospedera

15 En algunas de las modalidades, la invención también provee una molécula de ADN para su introducción en una célula (por ejemplo, una célula bacteriana, una célula de levadura o una célula de planta), en donde la molécula de ADN comprende un polinucleótido que, durante la expresión al ARN y la ingestión por

20 parte de una plaga de hemípteros, logra la supresión de un gen objetivo en una célula, tejido u órgano de la plaga. Por consiguiente, algunas de las modalidades proveen una molécula recombinante de ácido nucleico que comprende un polinucleótido con capacidad de ser expresado como una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh,

25 ARNip, miARN, ARNhc, y ARNhp) en una célula de planta de modo

de inhibir la expresión del gen objetivo en una plaga de hemípteros. Con el fin de iniciar o potenciar la expresión, dichas moléculas de ácido nucleico recombinantes pueden comprender uno o más elementos reguladores, dichos elementos reguladores pueden ser operativamente enlazados al polinucleótido con capacidad de ser expresado como un ARNi. Son conocidos los métodos para expresar la molécula de supresión de un gen en las plantas, y se pueden utilizar para expresar un polinucleótido de la presente invención. Ver, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT No. WO06/073727; y la Publicación de la Patente Estadounidense No. 2006/0200878 A1.

En modalidades específicas, una molécula de ADN recombinante de la invención puede comprender un polinucleótido que codifica un ARN que puede formar una molécula de ARNdh. Dichas moléculas de ADN recombinantes pueden codificar los ARN que pueden formar moléculas de ARNdh capaces de inhibir la expresión del gen(es) objetivo endógeno en una célula de la plaga de hemípteros luego de la ingestión. En muchas de las modalidades, un ARN transcrito puede formar una molécula de ARNdh que puede ser suministrada en una forma estabilizada; por ejemplo, como una estructura de horquilla y tallo y lazo estable.

En otras modalidades, una hebra de una molécula de ARNdh puede ser formada mediante la transcripción de un polinucleótido que es sustancialmente homólogo a un polinucleótido que se selecciona del grupo que consiste de cualquiera de las SEQ ID NO:1,

y SEQ ID NO: 2; el complemento de SEQ ID NO:1; el complemento de SEQ ID NO:2; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:1 y/o 2; el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:1 y/o 2; un polinucleótido codificador nativo de un organismo hemíptero(*por ej.*, BSB) que comprende SEQ ID NO:1 y/o 2; el complemento de un polinucleótido codificador nativo de un organismo hemíptero que comprende SEQ ID NO:1 y/o 2; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificador nativo de un organismo hemíptero que comprende SEQ ID NO:1 y/o 2; y el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificador nativo de un organismo hemíptero que comprende SEQ ID NO:1 y/o 2.

En modalidades particulares, una molécula de ADN recombinante que codifica un ARN que puede formar una molécula de ARNdh puede comprender una región codificante en donde por lo menos dos polinucleótidos están dispuestos de manera que un polinucleótido está en una orientación homosentido, y el otro polinucleótido está en una orientación antisentido, con relación a por lo menos un promotor, en donde el polinucleótido homosentido y el polinucleótido antisentido están enlazados o conectados por un espaciador, por ejemplo, desde aproximadamente cinco (~5) hasta aproximadamente un mil (~1000) nucleótidos. El espaciador puede formar un bucle entre los polinucleótidos homosentido y antisentido. El polinucleótido homosentido o el polinucleótido antisentido pueden

ser sustancialmente homólogos a un gen objetivo (por ejemplo, un gen *Hunchback* que comprende la SEQ ID NO:1) o fragmento de las mismas. En algunas de las modalidades sin embargo, una molécula de ADN recombinante puede codificar un ARN que puede formar una
5 molécula de ARNdh sin un espaciador. En las modalidades, un polinucleótido codificante homosentido y polinucleótido codificante antisentido pueden ser de diferentes longitudes.

Los polinucleótidos identificados que tienen un efecto nocivo en una plaga de hemípteros o un efecto protector para las plantas
10 con respecto a la plaga pueden ser fácilmente incorporados en la molécula expresada de ARNdh a través de la creación de casetes de expresión apropiados en una molécula recombinante de ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, dichos polinucleótidos pueden ser expresados como una estructura de lazo estable tomando un
15 primer segmento correspondiente a un polinucleótido del gen objetivo (por ejemplo, un gen *Hunchback* que comprende la SEQ ID NO:1, y fragmentos de cualquiera de las anteriores); enlazando este polinucleótido a una región espaciadora del segundo segmento que no es homólogo o complementario al primer segmento; y enlazando
20 éste a un tercer segmento, en donde por lo menos una porción del tercer segmento es sustancialmente complementario al primer segmento. Dicho constructo forma una estructura de horquilla estable mediante el apareamiento de bases intramoleculares del primer segmento con el tercer segmento, en donde la forma de la estructura
25 de lazo estable comprende el segundo segmento. Ver, por ejemplo,

las Publicaciones de Patentes Estadounidenses Nos. 2002/0048814 y 2003/0018993; y las Publicaciones Internacionales PCT Nos. WO94/01550 y WO98/05770. Una molécula de ARNdh se puede generar, por ejemplo, en forma de una estructura de doble hebra tal como una estructura de horquilla estable (por ejemplo, horquilla), por medio de la cual la producción del ARNip elegido como objetivo para un polinucleótido nativo de una plaga de hemípteros es potenciada por medio de la co-expresión de un fragmento del gen elegido como objetivo, por ejemplo, en un casete expresable en planta adicional, que conduce a la producción de ARNip potenciada, o reduce la metilación a fin de prevenir el silenciamiento transcripcional de los genes del promotor de la horquilla de ARNdh.

Las modalidades de la invención incluyen la introducción de una molécula recombinante de ácido nucleico de la presente invención en una planta (es decir, transformación) para lograr los niveles inhibidores de la plaga de 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 uno circular cerrado. El sistema vectorial puede ser un único vector o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el DNA total a ser introducido en el genoma de un hospedero. Además, un vector puede ser un vector de expresión. Los ácidos nucleicos de la invención pueden, por ejemplo, ser insertados de manera adecuada en un vector bajo el control de un promotor apropiado que funciona en uno o más hospederos para activar la expresión de un

polinucleótido codificante enlazado u otro elemento del ADN. Muchos vectores están disponibles para este propósito, y la selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño del ácido nucleico a ser insertado en el vector y la célula hospedera particular a ser transformada con el vector. Cada vector contiene varios componentes dependiendo de su función (por ejemplo, amplificación del ADN o expresión del ADN) y la célula hospedera particular con la cual es compatible.

A fin de impartir protección contra las plagas de hemípteros a una planta transgénica, un ADN recombinante puede, por ejemplo, ser transcrito en una molécula de ARNi (por ejemplo, una molécula de ARN que forma una molécula de ARNdh) dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante. Una molécula de ARNi puede comprender un polinucleótido que es sustancialmente homólogo y específicamente hibridizable a un correspondiente polinucleótido transcrito dentro de una plaga de hemípteros que puede ocasionar daños a las especies de la planta huésped. La plaga de hemípteros puede tener contacto con la molécula de ARNi que es transcrita en células de la planta huésped transgénica, por ejemplo, ingiriendo las células o fluidos de la planta huésped transgénica que comprende la molécula de ARNi. Por consiguiente, la expresión de un gen objetivo es suprimida por la molécula de ARNi dentro de las plagas de hemípteros que infestan la planta huésped transgénica. En algunas de las modalidades, la supresión de la expresión del gen objetivo en una plaga objetivo de hemípteros puede resultar en la planta siendo

protegida del ataque de la plaga.

Con el fin de permitir la liberación de las moléculas de ARNi a una plaga de hemípteros en una relación nutricional con una célula de la planta que ha sido transformada con una molécula recombinate de ácido nucleico de la invención, se requiere la expresión (es decir, transcripción) de las moléculas de ARNi en la célula de la planta. En consecuencia, una molécula recombinate de ácido nucleico puede comprender un polinucleótido de la invención operativamente enlazado a uno o más elementos reguladores, tal como un elemento promotor heterólogo que funciona en una célula hospedera, tal como una célula bacteriana en donde la molécula de ácido nucleico va a ser amplificada, y una célula de planta en donde la molécula de ácido nucleico va a ser expresada.

Los promotores adecuados para su uso en las moléculas de ácido nucleico de la presente invención incluyen aquéllos que son inducibles, virales, sintéticos o constitutivos, todos los cuales son muy conocidos en el arte. Los ejemplos no limitativos que describen dichos promotores incluyen las Patentes Estadounidenses Nos. 6,437,217 (promotor RS81 de maíz dulce); 5,641,876 (promotor de la actina del arroz); 6,426,446 (promotor RS324 del maíz dulce); 6,429,362 (promotor PR-1 del maíz dulce); 6,232,526 (promotor A3 del maíz dulce); 6,177,611 (promotores constitutivos del maíz dulce); 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142 y 5,530,196 (promotor 35S de CaMV); 6,433,252 (promotor de la oleosina L3 de maíz dulce); 6,429,357 (promotor de la actina 2 del arroz, e intrón de la actina 2

del arroz); 6,294,714 (promotores inducibles por la luz); 6,140,078 (promotores inducibles por las sales); 6,252,138 (promotores inducibles por patógenos); 6,175,060 (promotores inducibles por la deficiencia de fósforo); 6,388,170 (promotores bidireccionales);

5 6,635,806 (promotor de la gama coixina); y la Publicación de Patente Estadounidense No. 2009/757,089 (promotores de la aldolasa de cloroplastos del maíz dulce). Los promotores adicionales incluyen el promotor de la nopalina sintasa (NOS) (Ebert *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 84(16):5745-9) y los promotores de la octopina

10 sintasa (OCS) (los cuales son portados en plásmidos inductores de tumor de *Agrobacterium tumefaciens*); los promotores de caulimovirus tal como el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Lawton *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. 9:315-24); el promotor 35S de CaMV (Odell *et al.* (1985) Nature 313:810-2; el

15 promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia (Walker *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 84(19):6624-8); el promotor de la sacarosa sintasa (Yang y Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 87:4144-8); el promotor del complejo del gen R (Chandler *et al.* (1989) Plant Cell 1:1175-83); el promotor del gen de la proteína de

20 enlazamiento de la 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, 6,051,753 y 5,378,619); un promotor PC1SV (Patente Estadounidense No, 5,850,019); el promotor SCP1 (Patente Estadounidense No, 6,677,503); y

25 promotores AGRtu.nos (Acceso a GENBANK® No. V00087; Depicker

et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:561-73; Bevan *et al.* (1983) Nature 304:184-7).

En modalidades particulares, las moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden un promotor específico del tejido, tal como un promotor específico de hoja o promotor específico de polen. En algunas modalidades, un polinucleótido o fragmento para control de plagas de hemípteros de acuerdo con la invención puede ser clonado entre dos promotores específicos de la raíz orientados en direcciones transcripcionales opuestas con relación al polinucleótido o fragmento, y que son operables en una célula de planta transgénica y expresados en la misma para producir moléculas de ARN en la célula de planta transgénica que posteriormente pueden formar moléculas de ARNdh, tal como se describe, *supra*. Las moléculas de ARNi expresadas en los tejidos de la planta pueden ser ingeridas por una plaga de hemípteros de modo que se logra la supresión de la expresión del gen objetivo.

Los elementos reguladores adicionales que pueden opcionalmente ser operativamente enlazados a un ácido nucleico incluyen 5'UTR localizados entre un elemento promotor y un polinucleótido codificante que funcionan como un elemento líder de traducción. El elemento líder de traducción está presente en el ARNm completamente procesado, y puede afectar el procesamiento del transcrito primario, y/o la estabilidad del ARN. Los ejemplos de elementos líderes de traducción incluyen líderes de proteínas de choque térmico de maíz dulce y petunia (Patente Estadounidense No.

5,362,865), líderes de proteínas de cubierta de virus de plantas, líderes de rubisco vegetal y otros. Ver, por ejemplo, Turner y Foster (1995) *Molecular Biotech.* 3(3):225-36. Los ejemplos no limitativos de 5'UTR incluyen GmHsp (Patente Estadounidense No. 5,659,122);
 5 PhDnaK (Patente Estadounidense No. 5,362,865); AtAnt1; TEV (Carrington y Freed (1990) *J. Virol.* 64:1590-7); y AGRtunos (Acceso a GENBANK® No. V00087; y Bevan *et al.* (1983) *Nature* 304:184-7).

Los elementos reguladores adicionales que opcionalmente pueden ser operativamente enlazados a un ácido nucleico también
 10 incluyen elementos no traducidos 3', regiones de terminación de la transcripción 3', o regiones de poliadenilación. Estos son elementos genéticos localizados cadena abajo de un polinucleótido, e incluyen polinucleótidos que proveen la señal de poliadenilación y/u otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción o
 15 procesamiento del ARNm. La señal de poliadenilación funciona en las plantas causando la adición de nucleótidos de poliadenilato en el extremo 3' del precursor de ARNm. El elemento de poliadenilación puede ser derivado de una variedad de genes vegetales, o de los genes ADN-T. Un ejemplo no limitativo de una región de terminación
 20 de la transcripción 3' es la región 3' de la nopalina sintasa (nos 3'; Fraley *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 80:4803-7). Un ejemplo del uso de diferentes regiones 3' no traducidas se proporciona en Ingelbrecht *et al.*, (1989) *Plant Cell* 1:671-80. Los ejemplos no limitativos de señales de poliadenilación incluyen uno de
 25 un gen RbcS2 de *Pisum sativum* (Ps.RbcS2-E9; Coruzzi *et al.* (1984)

EMBO J. 3:1671-9) y AGRtu.nos (Acceso a GENBANK® No. E01312).

Algunas de las modalidades pueden incluir un vector de transformación de plantas que comprende una molécula de ADN aislada y purificada que comprende por lo menos uno de los
5 elementos reguladores descritos líneas antes operativamente enlazado a uno o más polinucleótidos de la presente invención. Cuando son expresados, uno o más polinucleótidos resultan en una o más molécula(s) de ARNi que comprenden un polinucleótido que es específicamente complementario a todo o parte de una molécula
10 nativa de ARN en una plaga de hemípteros. Por consiguiente, el polinucleótido(s) puede comprender un segmento que codifica todo o parte de un poliribonucleótido presente dentro de un transcrito de ARN de una plaga de hemípteros elegido como objetivo, y puede comprender repeticiones invertidas de todo o parte de un transcrito
15 de plaga elegido como objetivo. Un vector de transformación de plantas puede contener polinucleótidos específicamente complementarios a más de un polinucleótido objetivo, permitiendo de este modo la producción de más de un ARNdh para la inhibición de la expresión de dos o más genes en las células de una o más
20 poblaciones o especies de plagas de hemípteros objetivo. Los segmentos de polinucleótidos específicamente complementarios a los polinucleótidos presentes en diferentes genes pueden ser combinados en una única molécula compuesta de ácido nucleico para la expresión en una planta transgénica. Tales segmentos
25 pueden ser contiguos o separados por un espaciador.

En algunas de las modalidades, un plásmido de la presente invención que ya contiene por lo menos un polinucleótido(s) de la invención puede ser modificado por la inserción secuencial de polinucleótido(s) adicional en el mismo plásmido, en donde el

5 polinucleótido(s) adicional está operativamente enlazado a los mismos elementos reguladores como el original por lo menos un polinucleótido(s). En algunas de las modalidades, una molécula de ácido nucleico puede ser diseñada para la inhibición de múltiples genes objetivo. En algunas de las modalidades múltiples genes a ser

10 inhibidos se pueden obtener de la misma especie de plaga de hemípteros, lo que puede potenciar la eficacia de la molécula de ácido nucleico. En otras modalidades, los genes pueden ser derivados a partir de diferentes plagas de hemípteros, lo que puede ampliar el rango de las plagas contra las cuales el/los agente(s)

15 es/son efectivos. Cuando se eligen múltiples genes como objetivo para la supresión o una combinación de expresión y supresión, un elemento de ADN poli-cistrónico puede ser diseñado genéticamente.

Una vector o molécula recombinante de ácido nucleico de la presente invención puede comprender un marcador seleccionable

20 que confiere un fenotipo seleccionable en una célula transformada, tal como una célula de planta. También se pueden utilizar marcadores seleccionables para seleccionar plantas o células de plantas que comprenden una molécula recombinante de ácido nucleico de la invención. El marcador puede codificar la resistencia a

25 los biocidas, resistencia a los antibióticos (por ejemplo, kanamicina,

geneticina (G418), bleomicina, higromicina, *etc.*), o tolerancia a los herbicidas (por ejemplo, glifosato, *etc.*). Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, pero sin estar limitados a: un gen *neo* que codifica la resistencia a la kanamicina y puede ser seleccionado para
5 utilizar kanamicina, G418, *etc.*; un gen *bar* que codifica la resistencia a bialafos; un gen mutante de la EPSP sintasa que codifica la tolerancia al glifosato; un gen de la *nitrilasa* que confiere resistencia al bromoxinilo; un gen mutante para la acetolactato sintasa (*ALS*) que confiere tolerancia a la imidazolinona o sulfonilurea; y un gen
10 *DHFR* resistente al metotrexato. Múltiples marcadores seleccionables están disponibles que confieren resistencia a la ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina, espectinomina, rifampicina, estreptomicina y tetraciclina y los similares. Los
15 ejemplos de dichos 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 o vector recombinante de ácido nucleico de la presente invención también puede incluir un marcador identificable.
20 Los marcadores identificables se pueden utilizar para monitorear la expresión. Los marcadores identificables ejemplares incluyen una β -glucuronidasa o gen *uidA* (GUS) que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos (Jefferson *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405); un gen locus R, que codifica
25 un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina

(color rojo) en 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. (Nueva York: Plenum), pp. 263-82); un gen β -lactamasa (Sutcliffe *et al.* (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 75:3737-41); un gen que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen para luciferasa (Ow *et al.* (1986) Science 234:856-9); un gen *xyIE* que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir catecoles cromogénicos (Zukowski *et al.* (1983) Gene 46(2-3):247-55); un gen para amilasa (Ikatu *et al.* (1990) Bio/Technol. 8:241-2); un gen de tirosinasa que codifica una enzima con capacidad de oxidar la tirosina a DOPA y la dopaquinona que a su vez condensa a melanina (Katz *et al.* (1983) J. Gen. Microbiol. 129:2703-14); y una α -galactosidasa.

En algunas de las modalidades, las moléculas recombinantes de ácido nucleico, tal como se describe, *supra*, se pueden utilizar en los métodos para la creación de plantas transgénicas y expresión de ácidos nucleicos heterólogos en las plantas a fin de preparar plantas transgénicas que exhiben susceptibilidad reducida a las plagas de hemípteros. Se pueden preparar vectores de transformación de plantas, por ejemplo, insertando moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de ARNi en los vectores de transformación de plantas e introduciendo éstos en las plantas.

Los métodos adecuados para la transformación de células

hospederas incluyen cualquier método por medio del cual el ADN puede ser introducido en una célula, tal como mediante transformación de protoplastos (Ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5,508,184), mediante absorción de ADN
5 mediada por desecación/inhibición (Ver, por ejemplo, Potrykus *et al.* (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183-8), mediante electroporación (Ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5,384,253), mediante agitación con fibras de carburo de silicio (Ver, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 5,302,523 y 5,464,765), mediante
10 transformación mediada por *Agrobacterium* (Ver, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 5,563,055; 5,591,616; 5,693,512; 5,824,877; 5,981,840 y 6,384,301) y mediante aceleración de las partículas recubiertas de ADN (Ver, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 5,015,580; 5,550,318; 5,538,880; 6,160,208;
15 6,399,861 y 6,403,865), *etc.* Las técnicas que son particularmente útiles para la transformación del maíz se describen, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 7,060,876 y 5,591,616; y la Publicación Internacional PCT WO95/06722. A través de la aplicación de técnicas como éstas, las células de virtualmente
20 cualquier especie pueden ser transformadas de manera estable. En algunas de las modalidades, la transformación del ADN está integrada en el genoma de la célula hospedera. En el caso de especies multicelulares, las células transgénicas pueden ser regeneradas en un organismo transgénico. Cualquiera de estas
25 técnicas se puede utilizar para producir una planta transgénica, por

ejemplo, que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican 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 *Agrobacterium*. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias patógenas de la tierra para plantas que genéticamente transforman las células de las plantas. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta. Los plásmidos Ti (inductores de tumor) contienen un segmento largo, conocido como ADN-T, que es transferido a las plantas transformadas. Otro segmento del plásmido Ti, la región Vir, es responsable de la transferencia del ADN-T. La región ADN-T está limitada por repeticiones terminales. En los vectores binarios modificados, los genes inductores de tumor han sido eliminados, y las funciones de la región Vir se utilizan para transferir ADN foráneo limitado por los elementos de frontera de ADN-T. La región T también puede contener un marcador seleccionable para la recuperación eficiente de las células y plantas transgénicas, y un sitio de clonación múltiple para la inserción de polinucleótidos para la transferencia tal como un ácido nucleico que codifica ARNdh.

En algunas modalidades, en algunas de las modalidades un vector de transformación de plantas es derivado de un plásmido 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 plantas adicionales incluyen, por ejemplo y sin limitación, aquéllos descritos por Herrera-Estrella *et al.* (1983) Nature 303:209-13; Bevan *et al.* (1983) Nature 304:184-7; 5 Klee *et al.* (1985) Bio/Technol. 3:637-42; y en la Patente Europea No. EP 0 120 516, y aquéllas que se derivan de cualquiera de las anteriormente mencionadas. Otras bacterias tal como *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, y *Mesorhizobium* que interactúan con las plantas naturalmente pueden ser modificadas para mediar la transferencia de 10 genes a una cantidad de diversas plantas. Estas bacterias simbióticas asociadas a las plantas se pueden hacer competentes para la transferencia de genes mediante la adquisición tanto de un plásmido Ti sin extensiones como de un vector binario adecuado.

Después de suministrar el ADN exógeno a las células 15 receptoras, las células transformadas son generalmente identificadas para el cultivo posterior y la regeneración de las plantas. Con el fin de mejorar la capacidad para identificar las células transformadas, puede ser deseable utilizar un gen marcador seleccionable o identificable, tal como se indicó líneas antes, con el vector de 20 transformación usado para generar el transformante. En el caso cuando se utiliza un marcador seleccionable, las células transformadas son identificadas dentro de la población celular potencialmente transformadas exponiendo las células a un agente o agentes selectivos. En el caso cuando se utiliza un marcador 25 identificable, las células pueden ser identificadas por el rasgo

genético deseado del marcador.

Las células que sobreviven la exposición al agente selectivo, o las células que han sido evaluadas positivas en una prueba de identificación, pueden ser cultivadas en medios que soporten la regeneración de las plantas. En algunas de las modalidades, cualquier medio de cultivo de tejidos de planta adecuado (por ejemplo, medio MS y N6) puede ser modificado incluyendo otras sustancias, tales como reguladores del crecimiento. El tejido se puede mantener en un medio básico con reguladores del crecimiento hasta que esté disponible suficiente tejido para comenzar los esfuerzos de regeneración de la planta, o siguiendo rondas repetidas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración (por ejemplo, por lo menos 2 semanas), luego transferido a medios favorables para la formación de brotes. Los cultivos son transferidos periódicamente hasta que haya sucedido la suficiente formación de brotes. Una vez que los brotes están formados, ellos son transferidos a medios propicios para la formación de las raíces. Una vez que se han formado suficientes raíces, las plantas pueden ser transferidas a la tierra para su posterior crecimiento y maduración.

A fin de confirmar la presencia de una molécula de ácido nucleico de interés (por ejemplo, un ADN que codifica una o más moléculas de ARNi que inhiben la expresión del gen objetivo en una plaga de hemípteros) en las plantas de regeneración, se pueden llevar a cabo una variedad de ensayos. Tales ensayos incluyen, por

ejemplo: ensayos biológicos moleculares, tales como las inmunotransferencias Southern y Northern, PCR, y secuenciación del ácido nucleico; ensayos bioquímicos, tal como la detección de la presencia de una proteína producto, por ejemplo, por medios
5 inmunológicos (ELISA y/o técnicas Western blot) o mediante función enzimática; ensayos de partes de las plantas, tales como ensayos de la hoja o raíz; y análisis del fenotipo de toda la planta regenerada.

Se pueden analizar los eventos de integración, por ejemplo, mediante amplificación por PCR usando, por ejemplo, cebadores de
10 oligonucleótidos específicos para una molécula de ácido nucleico de interés. La clasificación genotípica por PCR se entiende que incluye, pero sin limitación a, la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN_g derivado del tejido calloso de la planta huésped aislada que se espera contenga una molécula de ácido
15 nucleico de interés integrada en el genoma, seguido por el análisis de la secuencia y clonación estándar de los productos de amplificación por PCR. Los métodos de clasificación genotípica por PCR han sido bien descritos (por ejemplo, Rios, G. *et al.* (2002) Plant J. 32:243-53) y se pueden aplicar al ADN_g derivado de
20 cualquier especie de planta (por ejemplo, *Z. mays*, *G. max* y algodón) o tipo de tejido, incluyendo cultivos celulares.

Una planta transgénica que se formó utilizando los métodos de transformación dependientes de *Agrobacterium* por lo general contiene un único ADN recombinante insertado en el cromosoma. El
25 polinucleótido del único ADN recombinante es referido como un

“evento transgénico” o “evento de integración”. Dichas plantas transgénicas son heterocigotas para el polinucleótido exógeno insertado. En algunas de las modalidades, una planta transgénica homocigota con relación a un transgen puede ser obtenida por
5 apareamiento sexual (autofertilización) de una planta transgénica segregante independiente que contiene un único gen exógeno consigo misma, por ejemplo, una planta T_0 , para producir semillas T_1 . Una cuarta parte de la semilla T_1 producida será homocigota con respecto al transgen. La germinación de la semilla T_1 da como
10 resultado plantas que pueden ser probadas por heterocigocidad, por lo general utilizando una prueba por SNP o una prueba de amplificación térmica que permite la distinción entre los heterocigotos y homocigotos (es decir, una prueba de cigosidad).

En modalidades particulares, por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
15 o 10 o más moléculas diferentes de ARNi son producidas en una célula de planta que tiene un efecto inhibidor para la plaga de hemípteros. Las moléculas de ARNi (por ejemplo, molécula de ARNdh) pueden ser expresadas a partir de ácidos nucleicos múltiples introducidos en diferentes eventos de transformación, o de un único
20 ácido nucleico introducido en un único evento de transformación. En algunas de las modalidades, una pluralidad de moléculas de ARNi son expresadas bajo el control de un único promotor. En otras modalidades, una pluralidad de moléculas de ARNi es expresada bajo el control de promotores múltiples. Se pueden expresar
25 moléculas únicas de ARNi que comprenden múltiples polinucleótidos

que son cada uno homólogos a diferentes loci dentro de una o más plagas de hemípteros (por ejemplo, los loci o lugares definidos por las SEQ ID NOs:1 y 2), en diferentes poblaciones de la misma especie de la plaga de hemípteros, o en diferentes especies de la plaga de hemípteros.

Además de la transformación directa de una planta con una molécula recombinante de ácido nucleico, las plantas transgénicas pueden ser preparadas cruzando una primera planta que tiene por lo menos un evento transgénico con una segunda planta que carece de dicho evento. Por ejemplo, una molécula recombinante de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ARNi puede ser introducido en una línea de la primera planta que es susceptible de transformación para producir una planta transgénica, dicha planta transgénica puede ser cruzada con una línea de la segunda planta para la introgresión del polinucleótido que codifica las molécula de ARNi en la línea de la segunda planta.

La invención también incluye productos básicos que contienen uno o más polinucleótidos de la invención. Las modalidades particulares incluyen productos básicos producidos a partir de una planta o semilla recombinante que contiene uno o más de los polinucleótidos de la presente invención. Un producto básico que contiene uno o más de los polinucleótidos de la presente invención está destinado a incluir, aunque sin limitarse a ello, harinas, aceites, granos triturados o enteros o semillas de una planta, o cualquier producto alimenticio que comprende cualquier harina, aceite o grano

triturado o entero de una planta o semilla recombinante que contiene uno o más de los polinucleótidos de la presente invención. La detección de uno o más de los polinucleótidos de la presente invención en uno o más productos básicos contemplados en la presente es prueba *de facto* que el producto básico es producido a partir de una planta transgénica diseñada para expresar uno o más de los polinucleótidos de la presente invención con el fin de controlar plagas de plantas utilizando métodos de supresión de gen mediados por ARNdh.

En algunos aspectos, se incluyen las semillas y productos básicos producidos por las plantas transgénicas derivadas de las células de las plantas transformadas, en donde las semillas o productos básicos comprenden una cantidad detectable de un ácido nucleico de la invención. En algunas de las modalidades, dichos productos básicos pueden ser producidos, por ejemplo, mediante la obtención de plantas transgénicas y la preparación de comida o alimentos a partir de las mismas. Los productos básicos que comprenden uno o más de los polinucleótidos de la invención incluyen, por ejemplo y sin limitación: harinas, aceites, granos triturados o enteros o semillas de una planta, y cualquier producto alimenticio que comprende cualquier harina, aceite, o grano triturado o entero de una planta recombinante o semilla que comprende uno o más de los ácidos nucleicos de la invención. La detección de uno o más de los polinucleótidos de la invención en una o más materias primas o productos básicos es una prueba *de facto* de que las

materias primas o productos básicos son producidos de una planta transgénica diseñada para expresar una o más de las moléculas de ARNi de la invención para los propósitos de controlar las plagas de hemípteros.

5 En algunas de las modalidades, una planta transgénica o semilla que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención también puede comprender por lo menos otro evento transgénico en su genoma, incluyendo sin limitación: un evento transgénico del cual se transcribe una molécula de ARNi que tiene
10 como objetivo un locus en una plaga de hemípteros distinto de aquél definido por las SEQ ID NOs:1 y 2; un evento transgénico del cual se transcribe una molécula de ARNi que tiene como objetivo un gen en un organismo distinto de una plaga de hemípteros (por ejemplo, un nematodo parasitario de las plantas); un gen que codifica un proteína
15 insecticida (por ejemplo, una proteína insecticida *Bacillus thuringiensis*, *Alcaligenes* spp., o *Pseudomonas* spp.); un gen de tolerancia a los herbicidas (por ejemplo, un gen que provee tolerancia al glifosato); y un gen que contribuye a un fenotipo deseable en la planta transgénica, tal como rendimiento
20 incrementado, metabolismo de los ácidos grasos alterado o restablecimiento de la esterilidad citoplasmática masculina. En modalidades particulares, los polinucleótidos que codifican las moléculas de ARNi de la invención pueden ser combinados con otros controles de insectos y rasgos de la enfermedad en una planta para
25 alcanzar los rasgos deseados para el control potenciado de las

enfermedades de las plantas y el daño de los insectos. Combinando los rasgos de control de insectos que utilizan modos de acción distintos se pueden proveer plantas transgénicas protegidas con durabilidad superior sobre las plantas que albergan un único rasgo de control, por ejemplo, debido a la probabilidad reducida de manera que la resistencia al rasgo(s) se desarrollará en el campo.

V. Supresión del gen objetivo en una plaga de hemípteros

A. Descripción general

En algunas de las modalidades de la invención, por lo menos una molécula de ácido nucleico útil para el control de las plagas de hemípteros se puede proveer a una plaga de hemípteros, en donde la molécula de ácido nucleico conduce al silenciamiento del gen mediado por el iARN en la plaga(s). En modalidades particulares, una molécula de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, y ARNhp) puede ser provista al hemíptero hospedero. En algunas de las modalidades, una molécula de ácido nucleico útil para el control de las plagas de hemípteros se puede proveer a una plaga poniendo en contacto la molécula de ácido nucleico con la plaga. En estas y otras modalidades adicionales, una molécula de ácido nucleico útil para el control de las plagas de hemípteros puede ser provista en un sustrato de alimentación de la plaga, por ejemplo, una composición nutricional. En estas y otras modalidades adicionales, se puede proveer una molécula de ácido nucleico útil para el control de una plaga de hemípteros a través de la ingestión del material vegetal que comprende la molécula de ácido nucleico que es ingerida por la

plaga. En ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico está presente en el material vegetal a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante introducido en el material vegetal, por ejemplo, mediante la transformación de una célula de planta con un
5 vector que comprende el ácido nucleico recombinante y la regeneración de un material vegetal o de toda la planta de la célula de la planta transformada.

B. Supresión del gen objetivo mediado por iARN

En determinadas modalidades, la presente invención provee
10 moléculas de ARNi (por ejemplo, ARNdh, ARNip, miARN, ARNhc, y ARNhp) que pueden ser diseñadas para elegir como objetivo polinucleótidos nativos esenciales (por ejemplo, genes esenciales) en el transcriptoma de una plaga de hemípteros (por ejemplo, una plaga de hemípteros (por ejemplo, BSB)), por ejemplo, diseñando
15 una molécula de ARNi que comprende por lo menos una hebra que comprende un polinucleótido que es específicamente complementario al polinucleótido objetivo. La secuencia de una molécula de ARNi así diseñada puede ser idéntica a aquélla del polinucleótido objetivo, o puede incorporar discrepancias que no previenen la hibridación
20 específica entre la molécula de ARNi y su polinucleótido objetivo.

Las moléculas de ARNi de la presente invención se pueden utilizar en métodos para la supresión de los genes en una plaga de hemípteros, de este modo se reduce el nivel o incidencia del daño ocasionado por la plaga en una planta (por ejemplo, una planta
25 transformada protegida que comprende una molécula de ARNi). Tal

como se utiliza en el presente documento, el término “supresión de los genes” se refiere a cualquiera de los métodos muy conocidos para la reducción de los niveles de proteína producida como resultado de la transcripción genética a ARNm y posterior traducción del ARNm, incluyendo la reducción de la expresión de la proteína de un gen o un polinucleótido codificante incluyendo la inhibición post-transcripcional de la expresión y la supresión transcripcional. La inhibición post-transcripcional es mediada por la homología específica entre todo o parte de un ARNm transcrito de un gen escogido como objetivo para la supresión y la correspondiente molécula de ARNi utilizada para supresión. De manera adicional, la inhibición post-transcripcional se refiere a la reducción sustancial y medible de la cantidad de ARNm disponible en la célula para el enlazamiento por medio de ribosomas.

En modalidades específicas en donde una molécula de ARNi es una molécula de ARNd_h, la molécula de ARNd_h puede ser escindida por la enzima, DICER, en moléculas cortas de ARNi_p (aproximadamente 20 nucleótidos en longitud). La molécula de ARNi_p de doble hebra generada por la actividad de DICER en el momento la molécula de ARNd_h puede ser separada en dos ARNi_p de una sola hebra; la “hebra pasajero” y la “hebra guía”. La hebra pasajero puede ser degradada y la hebra guía puede ser incorporada en RISC. La inhibición post-transcripcional se produce por hibridación específica de la hebra guía con un polinucleótido específicamente complementario de una molécula de ARNm, y

posterior escisión por la enzima, Argonaute (componente catalítico del complejo RISC).

En las modalidades de la presente invención, cualquier forma de molécula de ARNi puede ser utilizada. Aquellas personas expertas en el arte comprenderán que las moléculas de ARNd_h por lo general son más estables durante la preparación y durante la etapa de suministro de la molécula de ARNi a una célula que son moléculas de ARN de una sola hebra, y son por lo general también más estables en una célula. De esta manera, mientras que las moléculas de ARNi_p y miARN, por ejemplo, pueden ser de igual manera efectivas en algunas de las modalidades, una molécula de ARNd_h puede ser escogida debido a su estabilidad.

En modalidades particulares, se provee una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido, dicho polinucleótido puede ser expresado *in vitro* para producir una molécula de ARNi que es sustancialmente homóloga a una molécula de ácido nucleico codificada mediante un polinucleótido dentro del genoma de una plaga de hemípteros. En ciertas modalidades, la molécula de ARNi transcrita *in vitro* puede ser una molécula de ARNd_h estabilizada que comprende una estructura de horquilla. Después de que una plaga de hemípteros contacta la molécula de ARNi transcrita *in vitro*, se puede producir la inhibición post-transcripcional de un gen objetivo en la plaga (por ejemplo, un gen esencial).

En algunas de las modalidades de la presente invención, la expresión de una molécula de ácido nucleico que comprende por lo

menos 15 nucleótidos contiguos (por ejemplo, por lo menos 19 nucleótidos contiguos) de un polinucleótido se utiliza en un método para la inhibición post-transcripcional de un gen objetivo en una plaga de hemípteros, en donde el polinucleótido se selecciona del

5 grupo que consiste de: SEQ ID NO:1; el complemento de la SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; el complemento de la SEQ ID NO:2; 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 la SEQ ID NO:1; un fragmento de por lo

10 menos 15 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:2; el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:2; un polinucleótido codificador nativo de un organismo de hemípteros que comprende SEQ ID NO:1; el complemento de un polinucleótido codificador nativo de un organismo de hemípteros que

15 comprende SEQ ID NO:1; un polinucleótido codificador nativo de un organismo de hemípteros que comprende SEQ ID NO:2; el complemento de un polinucleótido codificador nativo de un organismo de hemípteros que comprende SEQ ID NO:2; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un

20 polinucleótido codificador nativo de un organismo de hemípteros que comprende SEQ ID NO:1; el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificador nativo de un organismo de hemípteros que comprende SEQ ID NO:1; un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un

25 polinucleótido codificador nativo de un organismo de hemípteros que

comprende SEQ ID NO:2; y el complemento de un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de un polinucleótido codificador nativo de un organismo de hemípteros que comprende SEQ ID NO:2. En ciertas modalidades, la expresión de una molécula de ácido nucleico que es por lo menos alrededor de 80% idéntica (por ejemplo, 79%, aproximadamente 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%) puede ser utilizada con cualquiera de las anteriormente mencionadas. En éstas y otras modalidades adicionales, una molécula de ácido nucleico puede ser expresada de manera que específicamente hibrida a una molécula de ARN presente en por lo menos una célula de una plaga de hemípteros.

Es una característica importante de algunas de las modalidades en el presente documento que el sistema de inhibición post-transcripcional del ARNi tiene la capacidad de tolerar variaciones en las secuencias entre los genes objetivo que pueden ser esperadas debido a mutación genética, polimorfismos de las cepas, o divergencia evolucionaria. La molécula introducida de ácido

nucleico puede no necesitar ser absolutamente homóloga a cualquiera de un producto de la transcripción primaria o un ARNm completamente procesado de un gen objetivo, mientras que la molécula introducida de ácido nucleico es de manera específica
5 hibridizable a cualquiera de un producto de la transcripción primaria o un ARNm completamente procesado del gen objetivo. De igual manera, la molécula introducida de ácido nucleico puede no necesitar ser de longitud completa, con relación a cualquiera de un producto de la transcripción primaria o un ARNm completamente
10 procesado del gen objetivo.

La inhibición de un gen objetivo utilizando la tecnología de ARNi de la presente invención es específica a la secuencia; es decir, los polinucleótidos sustancialmente homólogos a la molécula(s) de ARNi están dirigidos para la inhibición genética. En algunas de las
15 modalidades, una molécula de ARN que comprende un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que es idéntica a aquélla de una porción de un gen objetivo puede ser utilizada para la inhibición. En éstas y otras modalidades adicionales, puede ser utilizada una molécula de ARN que comprende un polinucleótido con una o más
20 inserciones, eliminaciones, y/o mutaciones puntuales con relación a un polinucleótido objetivo. En modalidades particulares, una molécula de ARNi y una porción de un gen objetivo pueden compartir, por ejemplo, por lo menos desde aproximadamente 80%, por lo menos desde aproximadamente 81%, por lo menos desde
25 aproximadamente 82%, por lo menos desde aproximadamente 83%,

por lo menos desde aproximadamente 84%, por lo menos desde aproximadamente 85%, por lo menos desde aproximadamente 86%, por lo menos desde aproximadamente 87%, por lo menos desde aproximadamente 88%, por lo menos desde aproximadamente 89%,
5 por lo menos desde aproximadamente 90%, por lo menos desde aproximadamente 91%, por lo menos desde aproximadamente 92%, por lo menos desde aproximadamente 93%, por lo menos desde aproximadamente 94%, por lo menos desde aproximadamente 95%, por lo menos desde aproximadamente 96%, por lo menos desde
10 aproximadamente 97%, por lo menos desde aproximadamente 98%, por lo menos desde aproximadamente 99%, por lo menos desde aproximadamente 100%, y 100% de identidad de secuencia. De manera alternativa, la región dúplex de una molécula de ARNdh puede ser de manera específica hibridizable con una porción de un
15 transcrito de gen objetivo. En moléculas específicamente hibridizables, un polinucleótido de longitud menos que completa que exhibe una mayor homología compensa un polinucleótido más extenso, menos homólogo. La longitud del polinucleótido de una región dúplex de una molécula de ARNdh que es idéntica a una
20 porción de un transcrito de gen objetivo puede ser de por lo menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, o por lo menos de aproximadamente 1000 bases. En algunas de las modalidades, puede ser utilizado un polinucleótido de más de 20-100 nucleótidos; por ejemplo, puede usarse un polinucleótido de 100-200 o 300-500
25 nucleótidos. En modalidades particulares, puede ser utilizado un

polinucleótido de más de aproximadamente 200-300 nucleótidos. En modalidades particulares, puede ser utilizado un polinucleótido de más de aproximadamente 500-1000 nucleótidos, dependiendo del tamaño del gen objetivo.

5 En ciertas modalidades, la expresión de un gen objetivo en una plaga de hemípteros puede ser inhibida en por lo menos 10%; por lo menos 33%; por lo menos 50%; o por lo menos 80% dentro de una célula de la plaga, de modo que toma lugar una inhibición significativa. La inhibición significativa se refiere a la inhibición a través de un umbral que resulta en un fenotipo detectable (por
10 ejemplo, cesación de desarrollo, *etc.*), o una disminución detectable en el ARN y/o gen producto que corresponde al gen objetivo que está siendo inhibido. Aunque, en ciertas modalidades de la presente invención, la inhibición se produce en sustancialmente todas las
15 células de la plaga, en otras modalidades la inhibición se produce solamente en un subconjunto de células que expresan el gen objetivo.

 En algunas de las modalidades, la supresión transcripcional es mediada por la presencia en una célula de una molécula de ARNdh
20 que exhibe una sustancial identidad de secuencia a un ADN promotor o el complemento del mismo para efectuar lo que se hace referencia como “trans supresión del promotor”. La supresión del gen puede ser efectiva contra los genes objetivo en una plaga de hemípteros que pueden ingerir o contactar dichas moléculas de ARNdh, por ejemplo,
25 al ingerir o contactar el material de la planta que contiene las

moléculas de ARNdh. Las moléculas de ARNdh para su uso en la trans supresión del promotor pueden ser de manera específica diseñadas para inhibir o suprimir la expresión de uno o más polinucleótidos homólogos o complementarios en las células de la
5 plaga de hemípteros. La supresión post-transcripcional del gen mediante ARN con orientación homosentido o antisentido para regular la expresión del gen en las células de plantas se divulga en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,107,065; 5,759,829; 5,283,184; y 5,231,020.

10 **C. Expresión de las moléculas ARNi provistas a una plaga de hemípteros**

La expresión de las moléculas de ARNi para la inhibición del gen mediada por ARNi en una plaga de hemípteros puede ser llevada a cabo en cualquiera de muchos formatos *in vitro* o *in vivo*. Las
15 moléculas de ARNi pueden entonces ser provistas a una plaga de hemípteros, por ejemplo, al poner en contacto las moléculas de ARNi con la plaga, o al hacer que la plaga ingiera o de otra manera internalice las moléculas de ARNi. Algunas de las modalidades incluyen plantas huéspedes transformadas de una plaga de
20 hemípteros, células de plantas transformadas, y progenie de las plantas transformadas. Las células de plantas transformadas y las plantas transformadas pueden ser manipuladas genéticamente para expresar una o más de las moléculas de ARNi, por ejemplo, bajo el control de un promotor heterólogo, para proveer un efecto protector
25 contra la plaga. De esta manera, cuando una célula de planta o

planta transgénica es consumida por una plaga de hemípteros durante la alimentación, la plaga puede ingerir las moléculas de ARNi expresadas en las células o plantas transgénicas. Los polinucleótidos de la presente invención también pueden ser
5 introducidos en una amplia variedad de microorganismos procariotas y eucariotas hospederos para producir las moléculas de ARNi. El término “microorganismo” incluye especies procariotas y eucariotas, tales como las bacterias y hongos.

La modulación de la expresión del gen puede incluir la
10 supresión parcial o completa de dicha expresión. En otra de las modalidades, un método para la supresión de la expresión del gen en una plaga de hemípteros comprende proveer en el tejido del hospedero de la plaga una cantidad supresora del gen de por lo menos una molécula de ARNdh formada siguiendo la transcripción de
15 un polinucleótido tal como se describe en el presente documento, por lo menos un segmento del mismo es complementario a un ARNm dentro de las células de la plaga de hemípteros. Una molécula de ARNdh, incluyendo su forma modificada tal como un ARNip, miARN, ARNhc, o molécula de ARNhp, ingerida por una plaga de hemípteros
20 puede ser de por lo menos desde aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o aproximadamente 100% idéntica a una molécula de ARN transcrita a partir de una molécula *Hunchback* de ADN, por ejemplo, que comprende un polinucleótido seleccionado del
25 grupo que consiste de las SEQ ID NO:1 y 2. Por consiguiente se

proveen las moléculas aisladas y sustancialmente purificadas de ácido nucleico incluyendo, pero no limitadas a, polinucleótidos que no se producen de manera natural y los constructos de ADN recombinante para proveer las moléculas de ARNdh, los cuales
5 suprimen o inhiben la expresión de un polinucleótido codificante endógeno o un polinucleótido codificante objetivo en una plaga de hemípteros cuando se introducen en el mismo.

Las modalidades particulares proveen un sistema de suministro para el suministro de las moléculas de ARNi para la inhibición
10 post-transcripcional de uno o más gen(es) objetivo en una plaga de hemípteros de plantas y el control de una población de la plaga de plantas. En algunas de las modalidades, el sistema de suministro comprende la ingestión de una célula de planta transgénica hospedera o los contenidos de la célula hospedera que comprenden
15 las moléculas de ARN transcritas en la célula hospedera. En éstas y otras modalidades adicionales, una célula de planta transgénica o una planta transgénica se crea de manera que contiene un constructo de ADN recombinante que provee una molécula de ARNdh estabilizada de la presente invención. Las células de plantas
20 transgénicas y las plantas transgénicas que comprenden los ácidos nucleicos que codifican una molécula de ARNi particular pueden ser producidas mediante el empleo de las tecnologías de ADN recombinante (dichas tecnologías básicas son muy conocidas en el arte) para construir un vector de transformación de plantas que
25 comprende un polinucleótido que codifica una molécula de ARNi de

la presente invención (por ejemplo, una molécula de ARNdh estabilizada); para transformar una célula de planta o planta; y para generar la célula de planta transgénica o la planta transgénica que contiene la molécula de ARNi transcrita.

5 Para impartir protección contra las plagas de hemípteros a una planta transgénica, una molécula de ADN recombinante puede, por ejemplo, ser transcrita en una molécula de ARNi, tal como una molécula de ARNdh, una molécula de ARNip, una molécula de miARN, una molécula de ARNhc, o una molécula de ARNhp. En
10 algunas de las modalidades, una molécula de ARN transcrita a partir de una molécula de ADN recombinante puede formar una molécula de ARNdh dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante. Dicha molécula de ARNdh puede estar compuesta en parte de un polinucleótido que es idéntico a un correspondiente polinucleótido
15 transcrito a partir de un ADN dentro de una plaga de hemípteros de un tipo que puede infestar la planta huésped. La expresión de un gen objetivo dentro de la plaga de hemípteros se suprime por medio de la molécula de ARNdh, y la supresión de la expresión del gen objetivo en la plaga de hemípteros resulta en la planta transgénica que está
20 siendo resistente a la plaga. Los efectos moduladores de las moléculas de ARNdh han demostrado que son aplicables a una variedad de genes expresados en las plagas, incluyendo, por ejemplo, genes endógenos responsables por el metabolismo celular o la transformación celular, incluyendo genes de mantenimiento;
25 factores de transcripción; genes relacionados con la muda; y otros

genes que codifican polipéptidos involucrados en el metabolismo celular o crecimiento y desarrollo normales.

Para la transcripción de un transgen *in vivo* o un constructo de expresión, una región reguladora (por ejemplo, promotora, 5 potenciadora, silenciadora, y señal de poliadenilación) puede ser utilizada en algunas de las modalidades para transcribir la hebra (o hebras) de ADN. Por consiguiente, en algunas de las modalidades, tal como se indica, *supra*, un polinucleótido para su uso en la producción de las moléculas de ARNi puede ser operativamente 10 enlazado a uno o más elementos promotores funcionales en una célula hospedera de planta. El promotor puede ser un promotor endógeno, normalmente residente en el genoma hospedero. El polinucleótido de la presente invención, bajo el control de un elemento promotor operativamente enlazado, puede ser además 15 flanqueado por elementos adicionales que de manera ventajosa afectan su transcripción y/o la estabilidad de un transcrito resultante. Dichos elementos pueden ser localizados cadena arriba del promotor operativamente enlazado, cadena abajo del extremo 3' del constructo de expresión, y se puede producir tanto cadena arriba del promotor 20 como cadena abajo del extremo 3' del constructo de expresión.

En algunas modalidades, la supresión de un gen objetivo (por ejemplo, gen *hunchback*) resulta en un fenotipo de ARNi parental; un fenotipo que es observable en progenie del sujeto (por ej., una plaga de hemípteros) en contacto con la molécula de iARN. En algunas 25 modalidades, el fenotipo de pARNi comprende la plaga que se

considera menos capaz de producir progenie viable. En los ejemplos particulares de pARNi, un ácido nucleico que inicia pARNi no aumenta la incidencia de mortalidad en una población en donde se suministra el ácido nucleico. En otros ejemplos de pARNi, un ácido nucleico que inicia pARNi también aumenta la incidencia de mortalidad en una población en la que se suministra ácido nucleico.

En algunas modalidades, una población de plagas de hemípteros se pone en contacto con una molécula iARN, que de esa forma resulta en pARNi, en donde las plagas sobreviven y se aparean para producir huevos que son menos capaces para incubar progenie viable que los huevos producidos por plagas de la misma especie que no proporcionan el ácido nucleico. En algunos ejemplos, dichas plagas no realizan ovoposición o producen menos huevos que los observados en plagas de la misma especie que no se ponen en contacto con la molécula de iARN. En algunos ejemplos, los huevos de la ovoposición por parte de dichas plagas no se incuban o se incuban a una proporción que es significativamente menos a la observable en las plagas de la misma especie que no se ponen en contacto con la molécula de iARN. En algunos ejemplos, las ninfas que se incuban de huevos de la ovoposición por parte de dichas plagas no son viables o son menos viables que lo observable en plagas de la misma especie que no se ponen en contacto con la molécula de iARN.

Los cultivos transgénicos que producen sustancias que proporcionan protección de la alimentación de insectos son

vulnerables a adaptación por la población de plaga de insectos objetivo que reduce la durabilidad de los beneficios de la sustancia de protección de insectos. Tradicionalmente, retardos en la adaptación de plaga de insecto a los cultivos transgénicos se
5 alcanza mediante (1) plantación de “refugios” (cultivos que no contienen las sustancias plaguicidas, y por lo tanto, permiten la supervivencia de insectos que son susceptibles a la sustancia plaguicida; y/o (2) la combinación de sustancias insecticidas con múltiples modos de acción contra las plagas objetivo, de manera que
10 los individuos que son resistentes a un modo de acción son destruidos mediante un segundo modo de acción.

En ejemplos particulares, las moléculas de iARN (por ejemplo expresadas a partir de un transgen en una planta huésped) representan nuevos modos de acción para combinar con *Bacillus*
15 *thuringiensis*, *Alcaligenes* spp., o *Pseudomonas* spp. , tecnología de proteína insecticida y/o tecnología de ARNi letal en pirámides de genes de manejo de Resistencia de insectos para mitigar el desarrollo de poblaciones de insectos resistentes a cualquiera de estas tecnologías de control.

20 El ARNi parental puede resultar en algunas modalidades en un tipo de control de plagas que es diferente del control obtenido por ARNi letal, y que puede combinarse con ARNi letal para resultar en control de plagas sinérgico. Así, en modalidades particulares, las moléculas de iARN para la inhibición post- transcripcional de uno o
25 más genes objetivo en una plaga de plaga de hemípteros puede

combinarse con otras moléculas de iARN para proporcionar objetivación de ARNi redundante y efectos de ARNi sinérgicos.

El ARNi (pARNi) parental que causa la mortalidad de huevos o la pérdida de viabilidad de huevos tiene el potencial de traer otros
5 beneficios de durabilidad a los cultivos transgénicos que utilizan ARNi y otros mecanismos para protección de insectos. pARNi impide que los insectos expuestos produzcan progenie, y por lo tanto que pasen a la próxima generación alelos con los mismos que confieran resistencia a la sustancia plaguicida. pARNi es particularmente útil
10 para extender la durabilidad de cultivos transgénicos protegidos de insectos cuando se combina con una o más sustancias plaguicidas adicionales que proporcionan protección a partir de las mismas poblaciones de plagas. Dichas sustancias plaguicidas adicionales pueden en algunas modalidades incluir, por ejemplo, ARNdh; ARNdh
15 activo en ninfas; proteínas insecticidas (tales como las derivadas de *Bacillus thuringiensis*, *Alcaligenes* spp., *Pseudomonas* spp. u otros organismos); y otras sustancias insecticidas. Este beneficio surge debido a que los insectos que son resistentes a las sustancias plaguicidas se producen como una proporción mayor de la población
20 en el cultivo transgénico que en el cultivo refugio. Si una proporción de alelos resistentes con alelos susceptibles que pasan a la generación siguiente es menor en la presencia de pARNi que en la ausencia de pARNi, la evolución de la resistencia será retardada.

Por ejemplo, pARNi no puede reducir el número de individuos
25 en una primera generación de plagas que ocasionan daño en una

plaga que expresa una molécula de iARN. Sin embargo, puede reducirse la capacidad de tales plagas para sostener una infestación a través de generaciones subsiguientes. En forma inversa, el ARNi letal puede destruir plagas que ya infestan la planta. Cuando el

5 pARNi se combina con ARNi letal, las plagas que se ponen en contacto con una molécula de iARN parental pueden reproducirse con plagas de fuera del sistema que no ha estado en contacto con el iARN, aunque, no obstante, la progenie de dicho acoplamiento puede no ser viable o menos viable, y así no poder infestar la planta. Al

10 mismo tiempo, las plagas que se ponen en contacto con una molécula de iARN letal pueden ser afectadas directamente. La combinación de estos dos efectos puede ser sinérgica, es decir el los efectos combinados de pARNi y ARNi letal pueden ser mayores que la suma de los efectos de pARNi y ARNi letal

15 independientemente. pARNi puede combinarse con ARNi letal, por ejemplo, al proporcionar una planta que expresa tanto moléculas de iARN letal y parental; suministrando en la misma ubicación una primera planta que expresa moléculas de iARN letal y una segunda planta que expresa moléculas de iARN parental; y/o poniendo en

20 contacto plagas hembras con la molécula pARNi, y subsecuentemente liberar las plagas en contacto en el medio de plantas, de manera que puedan acoplarse en forma improductiva con las plagas de plantas.

Algunas de las modalidades proveen métodos para la

25 reducción del daño a una planta huésped (por ejemplo, una planta de

maíz) causado por una plaga de hemípteros que se alimenta de la planta, en donde el método comprende proveer en la planta huésped una célula de planta transformada que expresa por lo menos una molécula de ácido nucleico de la presente invención, en donde la

5 molécula(s) de ácido nucleico funciona luego de ser absorbida por la plaga(s) para inhibir la expresión de un polinucleótido objetivo dentro de la plaga(s), dicha inhibición de la expresión resulta en una reproducción reducida, por ejemplo, además de mortalidad y/o desarrollo reducido de la plaga(s), reduciendo de este modo el daño

10 a la planta huésped causado por la plaga(s). En algunas de las modalidades, la molécula(s) de ácido nucleico comprende moléculas de ARNdh. En éstas y otras modalidades adicionales, la molécula(s) de ácido nucleico comprende moléculas de ARNdh de modo que cada una comprende más de un polinucleótido que es de manera

15 específica hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresado en una célula de la plaga de hemípteros. En algunas de las modalidades, la molécula(s) de ácido nucleico consiste de un polinucleótido que es de manera específica hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresado en una célula de la plaga de

20 hemípteros.

En modalidades alternativas, se provee un método para el incremento del rendimiento de un cultivo de maíz, en donde el método comprende introducir en una planta de maíz por lo menos una molécula de ácido nucleico de la presente invención; y cultivar la

25 planta de maíz para permitir la expresión de una molécula de ARNi

que comprende el ácido nucleico, en donde la expresión de una molécula de ARNi que comprende el ácido nucleico inhibe el daño y/o desarrollo de la plaga de hemípteros, reduciendo o eliminando de este modo una pérdida de rendimiento debido a la infestación de la plaga. En algunas de las modalidades, la molécula de ARNi es una molécula de ARNdh. En éstas y otras modalidades adicionales, la molécula(s) de ácido nucleico comprende las moléculas de ARNdh de modo que cada una comprende más de un polinucleótido que es de manera específica hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresado en una célula de la plaga de hemípteros. En algunas modalidades, la molécula(s) de ácido nucleico comprende un polinucleótido que es de manera específica hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresado en una célula de la plaga de hemípteros

En otras modalidades, se proporciona un método para aumentar el rendimiento de una planta de maíz, en donde el método comprende introducir en una plaga de hemípteros hembra (por ejemplo, por inyección, por ingestión, por aspersión, y por expresión a partir de un ADN) por lo menos una molécula de la invención; y liberar la plaga hembra en el cultivo, en donde los pares de apareamiento que incluyen la plaga hembra no pueden o son menos capaces de producir progenie viable, reduciendo o eliminando así una pérdida de rendimiento debido a la infestación de plaga de hemípteros. En modalidades particulares, dicho método proporciona control de generaciones subsiguientes de la plaga. En modalidades

similares, el método comprende introducir la molécula de ácido nucleico de la invención en una plaga de hemípteros, y liberar la plaga macho en el cultivo (por ejemplo, donde las plagas macho de pARNi producen menos esperma que los controles sin tratar). En

5 algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico es una molécula que se expresa para producir una molécula de ARNi. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ARNdh. En estas y otras modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende moléculas de ARNdh que cada una comprende más de un

10 polinucleótido que es específicamente hibridizable en una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de plaga de hemípteros. En algunas modalidades, la molécula(s) de ácido nucleico comprende un polinucleótido que es de manera específica hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresada en una célula de la plaga de

15 hemípteros.

En algunas modalidades, se provee un método para la modulación de la expresión de un gen objetivo en una plaga de hemípteros, el método comprende: transformar una célula de planta con un vector que comprende un polinucleótido que codifica por lo

20 menos una molécula de ARNi de la presente invención, en donde el polinucleótido se enlaza operativamente a un promotor y un elemento de terminación de transcripción; cultivar la célula de planta transformada bajo condiciones suficientes para permitir el desarrollo de un cultivo de células de planta incluyendo una pluralidad de

25 células de plantas transformadas; seleccionar las células de plantas

transformadas que han integrado el polinucleótido en sus genomas; identificar las células de plantas transformadas por su expresión de una molécula de ARNi codificada mediante el polinucleótido integrado; seleccionar una célula de planta transgénica que expresa la molécula de ARNi; y alimentar la célula de planta transgénica seleccionada a la plaga de hemípteros. Las plantas también pueden ser regeneradas a partir de células de plantas transformadas que expresan una molécula de ARNi codificada mediante la molécula de ácido nucleico integrada. En algunas de las modalidades, la molécula de ARNi es una molécula de ARNdH. En éstas y otras modalidades adicionales, la molécula(s) de ácido nucleico comprende las moléculas de ARNdH de modo que cada una comprende más de un polinucleótido que es de manera específica hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresado en una célula de la plaga de hemípteros. En algunas modalidades, la molécula(s) de ácido nucleico comprende un polinucleótido que es de manera específica hibridizable a una molécula de ácido nucleico expresado en una célula de la plaga de hemípteros.

Las moléculas de ARNi de la presente invención pueden ser incorporadas dentro de las semillas de una especie de planta (por ejemplo, soya), ya sea como un producto de la expresión de un gen recombinante incorporado en un genoma de las células de plantas, o incorporado en un recubrimiento o tratamiento de semillas que se aplica a la semilla antes de plantarlas. Una célula de planta que comprende un gen recombinante se considera que es un evento

transgénico. También se incluyen en las modalidades de la presente invención los sistemas de liberación para la liberación de las moléculas de ARNi a las plagas de hemípteros. Por ejemplo, las moléculas de ARNi de la presente invención pueden ser directamente

5 introducidas en las células de una plaga(s). Los métodos para la introducción pueden incluir la mezcla directa del ARNi con el tejido de la planta de un hospedero para la plaga(s) de insectos, así como también la aplicación de composiciones que comprenden las moléculas de ARNi de la presente invención al tejido de la planta

10 huésped. Por ejemplo, las moléculas de ARNi pueden ser rociadas sobre una superficie de la planta. De manera alternativa, una molécula de ARNi puede ser expresada mediante un microorganismo, y el microorganismo puede ser aplicado sobre la superficie de la planta, o introducido en una raíz o tallo mediante un medio físico tal

15 como una inyección. Tal como se discute, *supra*, una planta transgénica también puede ser manipulada genéticamente para expresar por lo menos una molécula de ARNi en una cantidad suficiente para matar las plagas de insectos conocidos por infestar la planta. Las moléculas de ARNi producidas mediante síntesis química

20 o enzimática también pueden ser formuladas en una manera consistente con las prácticas agrícolas comunes, y utilizadas como productos de rociado para el control del daño a las plantas por parte de una plaga de hemípteros. Las formulaciones pueden incluir los adyuvantes apropiados (por ejemplo, agentes tensoactivos y

25 humectantes) requeridos para la eficiente cobertura del follaje, así

como también protectores UV para proteger las moléculas de ARNi (por ejemplo, las moléculas de ARNdh) del daño por la luz UV. Dichos aditivos son comúnmente utilizados en la industria de bioinsecticidas, y son muy conocidos por aquellas personas expertas en el arte. Dichas aplicaciones pueden ser combinadas con otras aplicaciones insecticidas de rociado (biólogicamente basadas o de otra manera) para mejorar la protección de las plantas contra las plagas de hemípteros.

Todas las referencias, incluyendo publicaciones, patentes, y solicitudes de patentes, citadas en el presente documento se incorporan de esta manera como referencia en la medida en que ellas no sean inconsistentes con los detalles explícitos de la presente divulgación, y son de esta manera incorporadas en la misma medida como si cada una de las referencias fueran individual y específicamente indicadas que se incorporan como referencia y fueran enunciadas en su totalidad en el presente documento. Las referencias discutidas en el presente documento se proveen solamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente aplicación. Nada en el presente documento debe ser considerado como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anticipar dicha divulgación en virtud de invención previa.

Los siguientes Ejemplos se proveen para ilustrar ciertas características y/o aspectos particulares. Estos Ejemplos no deben ser considerados como limitantes de la presente divulgación a las características o aspectos particulares que se describen.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Constructos iARN

Preparación de las plantillas mediante PCR y síntesis del ARNd_h.

Las estrategias utilizadas para proveer las plantillas
 5 específicas para la producción de ARNd_h *Hunchback* se muestran en
 la **Figura 1A y la Figura 1B**. Las plantillas de ADN proyectadas para
 su uso en la síntesis de ARNd_h *Hunchback* fueron preparadas
 mediante PCR utilizando los pares de cebadores específicos 1 y el
 ADNc de primera hebra preparado a partir del ARN total. Para las
 10 regiones de gen objetivo seleccionadas de *hunchback*, se realizaron
 dos amplificaciones PCR separadas. FIG 1. La primera amplificación
 de PCR introduce una secuencia promotora T7 en los extremos 5' de
 las hebras homosen tido y antisen tido amplificadas. La segunda
 reacción incorpora una secuencia de promotor T7 en los extremos 5'
 15 de las hebras antisen tido. Los dos fragmentos de PCR amplificados
 para cada región de los genes objetivo fueron entonces mezclados
 en aproximadamente cantidades iguales, y la mezcla fue utilizada
 como plantilla de transcripción para la producción de ARNd_h. FIG: 1.

Para el control negativo de YFP, se realizó una amplificación
 20 de PCR única. FIG: 1B. La amplificación de PCR introdujo una
 secuencia de promotor T7 en los extremos 5' de las hebras sentido y
 antisen tido amplificadas. Los dos fragmentos amplificados de PCR
 para cada región de genes objetivo fueron después mezclados en
 cantidades aproximadamente iguales, y la mezcla se utilizó como
 25 patrón de transcripción para producción de ARNd_h. FIG. 1B. ARNd_h

para la región codificadora de YFP de control negativo se produjo utilizando cebadores específicos y un clon de ADN de la región codificadora de YFP como patrón. El producto de PCR amplificado para *hunchback* y YFP se utilizó como un patrón para la síntesis in vitro de ARNdh utilizando el kit de transcripción de alto rendimiento MEGAscript (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). . Los ARNdh sintetizados fueron purificados utilizando el kit RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) o un kit AMBION® MEGAscript® ARNi , esencialmente tal como lo indican las instrucciones del fabricante.

10 Las preparaciones de ARNdh se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro NANODROP® 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE) o un medio equivalente, y se analizaron por electroforesis de gen para determinar la pureza.

Ejemplo 2: Análisis de PCR en tiempo real

15 PCR cuantitativa en tiempo real: Se recolectaron tejidos de *E. heros* para qRT-PCR de hembras de 0 a tres días inyectadas con ARNdh y tal como se describe en el **Ejemplo 6**. Después de siete días, los ovarios de las hembras fueron diseccionados bajo un microscopio estéreo en 1X PBS (pH 7,4) libre de nucleasa y

20 congelados individualmente en hielo seco en microtubos de recolección. La disrupción de tejido se realizó con amortiguador de lisis RL y el pulverizador de tejido Klecko™ (Garcia Manufacturing, Visalia, CA). Después de la maceración de tejido, el ARN total fue aislado en formato de alto rendimiento utilizando un kit de 96

25 receptáculos de purificación de ARN total Norgen (Norgen Biotek

Corp, Ontario, Canadá) siguiendo el protocolo del fabricante y utilizando Turbo™ DNase (Life Technologies, Carlsbad, CA) durante 1 hora a 37 °C en el diluyente. La síntesis de cADN se realizó utilizando el kit de alta capacidad cADN RT (Life technologies, 5 Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante con las siguientes modificaciones. El ARN total se ajustó a 50 ng/μl con agua libre de nucleasa. Las muestras de ARN se calentaron a 70 °C por 10 minutos y se enfriaron a 4 °C. La mitad de las reacciones fueron iniciadas por adición de 5 μl de 2X mezcla. La mezcla de cebador, 10 que se suministró solamente como cebadores aleatorios, fue primero adicionada con oligo sintetizado especial T20VN (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) hasta una concentración final de 2 μM, a fin de mejorar la sensibilidad de los ensayos a base de 3'UTR . Siguiendo la síntesis de primeras hebras, las muestras fueron 15 diluidas 1:3 con agua libre de nucleasa.

Los cebadores de qRT-PCR de *E. heros* y las sondas de hidrólisis se diseñaron utilizando LightCycler Probe Design Software 2.0 (Roche, Basel, Suiza) para el gen de referencia y Primer Express®Software Version 3.0 (Applied Biosystems, Grand Island, 20 NY) para los genes objetivo (Tabla 2 complementaria). Los insectos no inyectados se utilizaron como controles. La actina de *E. heros* se utilizó como un gen de referencia. Las sondas se rotularon con FAM (6-Carboxi Fluoresceina Amidita). Las concentraciones de cebador finales fueron 0,4 μM y las concentraciones de sonda fueron 0,2 μM, 25 en volúmenes de reacción de 10 μl. Los niveles de transcrito relativo

se analizaron por hidrólisis de sonda qRT-PCR utilizando Roche LightCycler480 (Roche, Basel, Suiza). Todos los ensayos incluyeron controles negativos de no-patrón.(mezcla solamente). Para las curvas estándar, se incluyó un blanco en la placa de fuente para
 5 contaminación cruzada de muestra. Las condiciones de ciclado de PCR incluyeron una incubación de activación de objetivo de 10 minutos a 95 °C, seguida por 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, apareamiento/extensión a 60 °C por 40 segundos, y adquisición FAM a 72 °C por 1 segundo. La reacción fue seguida
 10 por un enfriamiento de 10 segundos a 40 °C. Los datos se analizaron utilizando LightCycler™ Software v1.5 y los cambios relativos en expresión se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen (2001) Métodos 25 (4):402-08).

Los insectos no inyectados y los insectos inyectados con *YFP*
 15 *ARNdh* se utilizaron como controles. Se utilizó *Actina* BSB (SEQ ID NO:14) como un gen de referencia (Ponton *et al.* (2011) J Insect Physiol 57 (6):840-50). Los cebadores y sondas para el gen de interés (GOI) y los genes de referencia aparecen en la **Tabla 1**.

20

25

Tabla 1. Oligonucleótidos y sondas para ensayo qPCR de hidrólisis de sonda de BSB.

5	GEN de referencia	NOMBRE	SECUENCIA
	<i>Actina</i>	Actina-F	TCAAGGAAAACTGTGCTATGT
	<i>Actina</i>	Actina-R	TACCGATGGTGATGACCTGA
	<i>Actina</i>	Actina-Fam	ACCGCCGCTGCC
	Objetivo	NOMBRE	SECUENCIA
	<i>hb</i>	hb-F_MGB	CCCGACTCCGGCACAA
	<i>hb</i>	hb-R_MGB	TGACCGTACTCCGCGTCAT
	<i>hb</i>	hb-FAM_MGB	TCGTAAAGAGGAGCCGCGA

10 Los niveles de transcrito de *hb* en ovario de *E. heros* caen significativamente (en más del 80%) después de inyección de ARNdh de *hb* dsARN (**FIG. 4**).

Ejemplo 3: Construcción de los vectores de transformación de plantas.

15 Los vectores de entrada que albergan un constructo de gen objetivo para la formación de la horquilla que comprende un segmento *Hunchback*(SEQ ID NO:1) se ensamblan utilizando una combinación de fragmentos químicamente sintetizados (DNA2.0, Menlo Park, CA) así como los métodos de clonación molecular

20 estándares. La formación intramolecular de la horquilla mediante transcritos primarios de ARN se facilita mediante la disposición de dos copias (dentro de una sola unidad de transcripción) de un segmento de la secuencia de gen objetivo *Hunchback* en orientación opuesta una de otra, los dos segmentos están siendo separados

25 mediante una secuencia enlazadora (por ejemplo, intrón ST-LS1,

SEQ ID NO:6; Vancanneyt *et al.* (1990) Mol. Gen. Genet. 220:245-50). Así, el transcrito primario de ARNm contiene las dos secuencias *Hunchback* de segmento de gen como grandes repeticiones invertidas una de otra, separadas por la secuencia

5 enlazadora. Una copia de un promotor (por ejemplo, ubiquitina 1 de maíz dulce, Patente Estadounidense No. 5,510,474; 35S de Virus del mosaico de coliflor (CaMV); promotores de los genes de actina del arroz; promotores de ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 de maíz dulce; promotor de ALS; promotor de gen faseolina; *cab*;

10 *rubisco*; *LAT52*; *Zm13*; y/o *apg*) se utilizan para activar la producción del transcrito de horquilla de ARNm primario, y un fragmento que comprende una región no traducida 3', por ejemplo, pero no limitados a, una gen 5 de peroxidasa de maíz dulce (Zm3'UTR Per5 v2; Patente Estadounidense No. 6,699,984), AtUbi10, AtEf1, o StPinII se

15 utiliza para terminar la transcripción del gen que expresa el ARN horquillado.

El vector de entrada antes descrito se utiliza en reacciones de recombinación estándar GATEWAY® con un vector de destino binario típico para producir vectores de transformación de expresión de ARN

20 horquillado de *Hunchback* para transformaciones de embriones de plantas mediadas por *Agrobacterium*.

Un vector binario de control negativo que comprende un gen que expresa un ARNdh YFP horquillado, es construido por medio de reacciones de recombinación estándares GATEWAY® con un vector

25 destino binario típico y el vector de entrada. El vector de entrada

comprende una secuencia horquilla YFP bajo el control de expresión de un promotor de ubiquitina 1 de maíz dulce (tal como se indica en líneas previas) y un fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen 5 de peroxidasa de maíz.

5 Un Vector destino binario comprende un gen de tolerancia a herbicidas (ariloxialcanoato dioxigenasa; *AAD-1* v3) (Patente Estadounidense No. 7838733(B2), y Wright *et al.* (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A 107:20240-20245) bajo la regulación de un promotor de planta operable (por ejemplo, promotor del badnavirus
10 baciliforme de la caña de azúcar (ScBV) (Schenk *et al.* (1999) Plant Molec. Biol. 39:1221-1230) o ZmUbi1 (Patente Estadounidense No. 5,510,474)). 5'UTR y el intrón de estos promotores, son posicionados entre el extremo 3' del segmento de promotor y el codón de inicio de la región codificante *AAD-1*. Un fragmento que comprende una región
15 3' no traducida de un gen lipasa de maíz dulce (ZmLip 3'UTR; Patente Estadounidense No. 7,179,902) se utiliza para terminar la transcripción del ARNm *AAD-1*.

 Un vector binario de control negativo adicional, que comprende un gen que expresa una proteína YFP, es construido por medio de
20 las reacciones de recombinación estándares GATEWAY® con un vector destino binario típico y el vector de entrada. El vector destino binario comprende un gen de tolerancia a los herbicidas (ariloxialcanoato dioxigenasa; *AAD-1* v3) (tal como se indica anteriormente) bajo la regulación de expresión de un promotor de
25 ubiquitina 1 de maíz dulce (tal como se indica en líneas previas) y un

fragmento que comprende una región 3' no traducida de un gen lipasa de maíz dulce (ZmLip 3'UTR). El vector de entrada comprende una región codificante YFP bajo el control de expresión de un promotor de ubiquitina 1 de maíz dulce y un fragmento que
 5 comprende una región 3' no traducida de un gen 5 de peroxidasa de maíz dulce.

Ejemplo 4: Cría de insectos y selección de gen candidato en chinche marrón del neotrópico (*Euschistus heros*)

Cría de insectos: Se criaron colonias de chinche marrón del
 10 neotrópico (BSB; *Euschistus heros*) en una incubadora a 27 °C, a 65% de Humedad Relativa, con un ciclo de luz: oscuridad 16:8 horas. Un gramo de huevos recolectados durante 2 a 3 días fueron germinados en recipientes de 5L con discos de papel de filtro en el fondo, y los recipientes fueron cubiertos con una malla #18 para
 15 ventilación. Cada recipiente de crianza produjo aproximadamente 300 a 400 adultos BSB. En todas las etapas, los insectos fueron alimentados con ejotes frescos tres veces por semana, y una bolsita de mezcla de semillas que contuvo semillas de girasol, frijoles de soya, y maníes (3:1:1 en relación de peso) fue remplazada una vez a
 20 la semana. El agua fue complementada en frascos con tapones de algodón como mechas. Después de las dos semanas iniciales, los insectos fueron transferidos en un nuevo recipiente una vez a la semana.

Selección de objetivo de IARN. Seis etapas del desarrollo de
 25 BSB fueron seleccionadas para la preparación de la biblioteca de

ARNm. El ARN Total fue extraído de los insectos congelados a -70 °C, y homogeneizado en 10 volúmenes de solución amortiguadora de Lisis/Enlazamiento en tubos de 2 mL Lysing MATRIX A (MP BIOMEDICALS, Santa Ana, CA) en un Instrumento FASTPREP®-24
 5 (MP BIOMEDICALS). El ARNm Total fue extraído utilizando un Kit de Aislamiento de miARN MIRVANA™ (AMBION; INVITROGEN) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El secuenciado del ARN utilizando un sistema ILLUMINA® HiSEQ® (San Diego, CA) suministró las secuencias de gen objetivo candidato para su uso en el
 10 tecnología de control de insectos de iARN. El HiSEQ® generó un total de aproximadamente 378 millones de lecturas para las muestras. Las lecturas fueron ensambladas individualmente para cada una de las muestras utilizando el software ensamblador TRINITY® (Grabherr *et al.* (2011) Nature Biotech. 29:644-652). Los transcritos ensamblados
 15 fueron combinados para generar un transcriptoma agrupado. Este transcriptoma agrupado de BSB contuvo 378.457 secuencias.

Identificación del ortólogo de *hunchback* BSB. Una búsqueda tBLASTn del transcriptoma agrupado BSB fue llevada a cabo utilizando las secuencias de *hunchback* de *Drosophila* (hb_PA; No.
 20 de Acceso GENBANK NP_731267). El *hunchback* de BSB (SEQ ID NO:1) fue identificado como un producto del gen objetivo candidato de *Euschistus heros* que puede llevar a la mortalidad de la plaga de hemípteros, o inhibición de crecimiento, desarrollo o reproducción de dicha plaga. Este gen codifica una proteína de HUNCHBACK, que
 25 corresponde al factor de transcripción de familia de proteínas de

dedo de zinc tipo C2H2, que también se define como un gen de espacio (*gap gene*), un gen cuya pérdida produce un espacio en el plan del cuerpo.

La secuencia de SEQ ID NO:1 es novedosa. No se encontró
 5 secuencia de nucleótidos homóloga significativa con una búsqueda en GENBANK. La homóloga más cercana de la secuencia de aminoácidos de BSB HUNCHBACK (SEQ ID NO:3) es una proteína de *Oncopeltus fasciatus* que tiene un Acceso de GENBANK No. AAR23151.1 (80% similar; 73% idéntica con respecto a la región de
 10 homología).

Preparación de la plantilla y síntesis del ARNdh El ADNc fue preparado a partir de ARN total de BSB extraído de un solo insecto joven adulto (aproximadamente 90 mg) utilizando el Reactivo TRIzol® (LIFE TECHNOLOGIES). El insecto fue homogeneizado a
 15 temperatura ambiente en un microtubo centrífugo de 1,5 mL con 200 µL de TRIzol® utilizando un mortero de granulados (FISHERBRAND Catálogo No. 12-141-363) y un Pestle Motor Mixer (COLE-PARMER, Vernon Hills, IL). A continuación de la homogeneización, fue agregado un adicional de 800 µL de TRIzol®, el homogeneizado fue
 20 sometido a agitación excéntrica, y luego incubado a temperatura ambiente por cinco minutos. Los desechos de las células fueron removidos mediante centrifugación y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. Siguiendo el protocolo de extracción recomendado por el fabricante TRIzol® para 1 mL de TRIzol®, el granulado de
 25 ARN fue secado a temperatura ambiente y re-suspendido en 200 µL

de Solución amortiguadora Tris de un GFX PCR ADN AND GEL EXTRACTION KIT (ILLUSTRA®; GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES) utilizando Solución amortiguadora de Elución Tipo 4 (es decir 10 mM de Tris-HCl pH de 8,0). La concentración de ARN fue determinada
 5 utilizando un espectrofotómetro NANODROP® 8000 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE).

El ADNc fue transcrito inversamente a partir de 5 µg de plantilla ARN total de BSB y cebador oligo dT utilizando un SUPERScript III FIRST-STRAND SYNTHESIS SYSTEM™ para
 10 RT-PCR (INVITROGEN), siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. El volumen final de la reacción de transcripción fue llevado a los 100 µL con agua libre de nucleasa.

Los cebadores BSB_hb-1 dsARN BSB_hb-1-F (SEQ ID NO:7) y BSB_hb-1-R (SEQ ID NO:8) se utilizaron para amplificar las plantillas
 15 de ADN para la transcripción de ARNdh. Las plantillas de ADN fueron amplificadas utilizando "Touchdown" PCR (temperatura de acoplamiento reducida de 60 °C hasta 50 °C en una disminución de 1 °C/ciclo) con 1 µL de ADNc (mencionado en líneas previas) como la plantilla. Los fragmentos que comprenden 469 bp de segmento de
 20 *hunchback* (es decir, BSB_hb-1; SEQ ID NO:2) fueron generados durante 35 ciclos de PCR. El procedimiento mencionado previamente también fue utilizado para amplificar a 301 bp la plantilla de control negativo YFPv2 (SEQ ID NO:9) utilizando los cebadores YFPv2_F (SEQ ID NO:10) y YFPv2_R (SEQ ID NO:11). Los cebadores
 25 específicos de BSB y los cebadores de YFPv2 contenían una

secuencia de promotor de fago T7 (SEQ ID NO: 4) en sus extremos 5', permitiendo el uso de dichos fragmentos de ADN de BSB para la transcripción de ARNdh.

Los ARNdh fueron sintetizados utilizando 2 μ L de producto de PCR (mencionado en líneas previas) como la plantilla con un kit ARNi T7 MEGASCRIP[®] (AMBION) utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Ver la Figura 1. El ARNdh fue cuantificado en un espectrofotómetro NANODROP[®] 8000, y diluido a 1 μ g/ μ L en 0.1X de solución amortiguadora TE libre de nucleasa (1 mM de Tris HCL, 0,1 mM de EDTA, pH de 7,4).

Ejemplo 5: Inyección de ARNdh en ninfas de 2do. Estadio de chinche marrón de neotrópico (*Euschistus heros*).

Dieta artificial de BSB: La dieta artificial para BSB fue preparada como a continuación y usada durante las dos semanas después de la preparación. Los ejotes liofilizados fueron mezclados a un polvo fino en un mezclador MAGIC BULLET[®], mientras que los maníes crudos (orgánicos) fueron mezclados en un mezclador MAGIC BULLET[®] separado. Los ingredientes secos mezclados fueron combinados (porcentajes en peso: ejotes, 35%; maníes, 35%; sacarosa, 5%; Complejo vitamínico (por ejemplo, Mezclas de Vitaminas para insectos Vanderzant, SIGMA-ALDRICH, Catálogo No. V1007), 0,9%); en un gran mezclador MAGIC BULLET[®], que fue tapado y bien agitado para mezclar los ingredientes. Los ingredientes secos mezclados fueron entonces agregados a un tazón de mezcla. En un recipiente separado, agua y agente anti-fúngico de

benomilo (50 ppm; 25 μ L de una solución a 20.000 ppm /50 mL de solución de dieta) fueron bien mezclados, y luego agregados a la mezcla de ingredientes secos. Todos los ingredientes fueron mezclados a mano hasta que la solución estuvo completamente mezclada. La dieta fue conformada en tamaños deseados, envuelta con holgura en papel de aluminio, calentada por 4 horas a 60 °C, y luego enfriada y almacenada a 4 °C.

Inyección de ARNdh en hemocoel de BSB: Los BSB fueron criados en una dieta de ejotes y semillas, como la colonia antes descrita, en un incubador a 27 °C y a 65% de Humedad Relativa y un fotoperiodo de luz:oscuridad 16:8 horas. Las ninfas del segundo estadio (cada una pesando de 1 a 1.5 mg) fueron manejadas con cuidado con un pequeño cepillo para prevenir lesiones, y fueron colocadas en una caja Petri en hielo para enfriar e inmovilizar los insectos. Cada insecto fue inyectado con 55.2 nL de 500 ng/ μ L de solución de ARNdh (es decir, 27.6 ng de ARNdh; dosis de 18.4 a 27.6 μ g/g de peso corporal). Las inyecciones fueron llevadas a cabo utilizando un inyector NANOJECT™ II (DRUMMOND SCIENTIFIC, Broomhall, PA), equipado con una aguja de inyección halada de un capilar de vidrio Drummond de 88,9 mm #3-000-203-G/X. La punta de la aguja fue rota, y el capilar fue rellenado con aceite mineral ligero y luego llenado con 2 a 3 μ L de ARNdh. El ARNdh fue inyectado en el abdomen de las ninfas (10 insectos inyectados por ARNdh por ensayo), y los ensayos fueron repetidos en tres diferentes días. Los insectos inyectados (5 por pozo) fueron transferidos a bandejas de

32 pozos (Bandeja de Crianza Bio-RT-32; BIO-SERV, Frenchtown, NJ) que contienen un granulado de dieta artificial para BSB, y cubiertos con lengüetas PULL-N- PEEL™ (BIO-CV-4; BIO-SERV). La humedad fue suministrada por medio de 1.25 mL de agua en un microtubo centrífugo de 1.5 mL con una mecha de algodón. Las bandejas fueron incubadas a 26.5 °C, 60% de humedad, y un fotoperiodo de 16:8 horas luz:oscuridad. Los conteos de viabilidad y pesos fueron tomados en el día 7 después de las inyecciones.

Inyección de ARNdh que objetiva mRNA de *hunchback* en
 10 ninfas de 2do. estadio de BSB. Se utilizó ARNdh homólogo a una región codificadora de YFP, YFPv2, como un control negativo en experimentos de inyección de BSB. Como se resumen en la **Tabla 2**, 27.6 ng de BSB_hb-1 dsARN inyectado en el hemocoel de BSB de Segundo estadio no llevó a una mayor mortalidad dentro de los siete
 15 días.

Tabla 2. Resultados de inyección de ARNdh de BSB *hunchback* en el hemocoel de ninfas de chinche marrón de 2° estadio siete días después de la inyección. La Tabla muestra el porcentaje de mortalidad, número N de ensayos, error estándar de la media (SEM) y un valor p de prueba t-Student de dos vías.

Tratamiento	% medio de mortalidad	SEM	Pruebas N	Ensayo-t (p)
BSB_hb-1	10,0	5,77	3	1.00E+00
No inyectado	13,3	3,33	3	6.43E-01
YFPv2 ARNdh	10,0	5,77	3	

Ejemplo 6: Incubación de huevos después de inyección de ARNdh en *Euschistus heros*.

Inyección de ARNdh en hemocoel de BSB. Los BSB se criaron tal como se describe anteriormente para la colonia. En los siguientes ejemplos, los adultos jóvenes (hasta una semana posterior a muda de adulto) se recolectaron y congelaron en un contenedor secundario en hielo. Hembras y machos fueron separados en base al bimorfismo estructural de la genitalidad. Los BSB hembras se manipularon con fórceps de entomología Featherweight y se les inyectó ARNdh utilizando el inyector NANOJECT™ II (DRUMMOND SCIENTIFIC, Broomhall, PA) equipado con una aguja de inyección empujada desde un capilar de vidrio Drummond de 8.9 cms #3-000-203-G/X. La punta de la aguja se rompió y el capilar se volvió a llenar con aceite mineral liviano y después se llenó con 3 µL ARNdh. Diez hembras (de aproximadamente 90 mg cada una) por tratamiento fueron inyectadas con ARNdh. Cada hembra fue inyectada en el abdomen dos veces consecutivamente con 69 nL 1 µg/µL ARNdh para un total de 138 nL (138 ng). Cada lote de diez hembras se movió en un recipiente de ~950 mL con una abertura en la tapa y malla #18 para ventilación. Se agregaron dos adultos machos a cada recipiente de diez hembras. Los insectos fueron suministrados con un vial/frasco de agua, ejotes y semillas, según se describe en el procedimiento de cría. Los insectos se mantuvieron a 26.5 °C, 60% humedad y fotoperíodo de luz:oscuridad de 16:8.

Los conteos de hembras sobrevivientes, huevos en ovoposición

e incubación de huevos se recolectaron en una base diaria comenzando de siete a nueve días después de la inyección y que continuaron hasta 24 días. Los huevos fueron retirados diariamente y se mantuvieron en cajas Petri o placas de múltiples receptáculos en una capa de 1% agarosa en agua. Los insectos adultos se transfirieron en recipientes con agua fresca y alimento cada semana.

Las inyecciones de ARNdH que objetiva *hunchback* en hembras de BSB reducen la ovoposición de huevos. En una ejemplificación, las hembras inyectadas con ARNdH que objetiva una secuencia de 301 nt (SEQ ID NO:9) de la región codificadora de YFP se utilizaron como un control negativo y se compararon con hembras no inyectadas y hembras inyectadas con ARNdH de BSB_hb-1 (SEQ ID NO:2). Como se resume en las **Tabla 3** y **Tabla 5** las hembras inyectadas con ARNdH de *hunchback* realizaron la ovoposición de menor número de huevos de controles inyectados y no inyectados con ARNdH de YFPv2. La **Tabla 7** muestra una diferencia estadística en el número de huevos ovidepositados por hembras inyectadas con ARNdH de *hunchback* cuando se comparan con aquellas inyectadas con ARNdH de YFP. Las tasas de incubación de los huevos anteriores se redujeron dramáticamente en todas las pruebas (**Tabla 4, Tabla 6, y Tabla 8**). Los resultados de las primeras dos semanas de ovoposición en la prueba 1 fueron también colocados en recipientes por semana, tal como se presenta en la **FIG. 5**. Mientras que la ovoposición no fue afectada, tanto el desarrollo como la incubación o recolección de huevos se vieron reducidos. Los huevos

que mostraron desarrollo tenían un fenotipo con estructuras de miembros y cabeza no desarrolladas (**FIG. 6.**).

Tabla 3. Número de huevos en ovoposición por hembra por día en ensayo 1. Diez hembras fueron inyectadas con ARNdh objetivado contra BSB *hunchback* o control negativo YFPv2. Conteo de huevos recolectados a partir del día 7 post-inyección y continuaron por 21 días consecutivos post inyección. Se realizaron ensayos T de dos vías en Excel.

10

ARNdh	Número total de huevos	# media de huevos/día/hembra	Desviación estándar	Error estándar	prueba-t(p)
BSB_hb-1	971	8.53	2.39	0.616	2.94E-01
YFPv2	1280	10.1	2.05	0.529	
no iny.	1429	9.53	2.89	0.747	7.52E-01

15

20

Tabla 4. Número de huevos incubados por hembra por día de ensayo 1. Diez hembras fueron inyectadas con ARNdh objetivado contra BSB *hunchback* o control negativo YFPv2. Los conteos de huevos incubados se recolectaron a partir del día 7 post-inyección y continuaron por 21 días consecutivos post inyección. Se realizaron ensayos t de dos vías en Excel con respecto a número medio incubado/día/hembra.

25

ARNdh	% incubación huevos	número total de huevos incubados	media # huevos/día/hembra	Desviación estándar	Error estándar	prueba-t(p)
BSB_hb-1	27.29	265	2.42	1.44	0.37	2.24E-03*
YFPv2	85.55	1095	8.66	1.84	0.48	
no iny.	76.84	1098	7.32	2.66	0.69	1.12E-01

* indica diferencia significativa (valor $p \leq 0.05$)

Tabla 5. Número de huevos en ovoposición por hembra por día en ensayo 2. Diez hembras fueron inyectadas con ARNdh objetivado contra BSB *hunchback* o control negativo YFPv2. Conteo de huevos recolectados a partir del día 9 post-inyección y continuó por 24 días consecutivos post inyección. Se realizaron ensayos t de dos vías en Excel.

ARNdh	Número total de huevos	media # huevos/día/hembra	Desviación estándar	Error estándar	<i>prueba-t(p)</i>
BSB_hb-1	625	7.27	1.69	0.437	2.82E-01
YFPv2	740	6.53	1.97	0.509	

Tabla 6. Número de huevos incubados por hembra por día de ensayo 2. Diez hembras fueron inyectadas con ARNdh objetivado contra BSB *hunchback* o control negativo YFPv2. Los conteos de huevos incubados se recolectaron a partir del día 9 post-inyección y continuaron por 24 días consecutivos post inyección. Se realizaron dos ensayos t de dos vías en Excel con respecto a número medio incubado/día/hembra.

ARNdh	% incubación huevos	número total de huevos incubados	media # huevos incubados/día/hembra	Desviación estándar	Error estándar	<i>prueba-t(p)</i>
BSB_hb-1	18.08	113	1.59	1.94	0.49	3.99E-05*
YFPv2	77.84	576	5.14	1.79	0.45	

* indica diferencia significativa (valor $p \leq 0.05$)

Tabla 7. Número de huevos en ovoposición por hembra por día en ensayo 3. Diez hembras fueron inyectadas con ARNdh objetivado contra BSB *hunchback* o control negativo YFPv2. Conteo de huevos

recolectados a partir del día 9 post-inyección y continuaron por 23 días consecutivos post inyección. Se realizaron ensayos T de dos vías en Excel.

5

ARNdh	Número total de huevos	media # huevos incubados/día/hembra	Desviación estándar	Error estándar	<i>prueba-t(p)</i>
BSB_hb-1	555	5.60	1.72	0.444	4.46E-02*
YFPv2	921	6.80	1.38	0.356	

* indica diferencia significativa (valor $p \leq 0.05$)

Tabla 8. Número de huevos incubados por hembra por día de ensayo 3. Diez hembras fueron inyectadas con ARNdh objetivado contra BSB *hunchback* o control negativo YFPv2. Los conteos de huevos incubados se recolectaron a partir del día 9 post-inyección y continuaron por 23 días consecutivos post inyección. Se realizaron dos ensayos t de dos vías en Excel con respecto a número medio incubado/día/hembra.

15

ARNdh	% incubación huevos	número total de huevos incubados	media # huevos incubados/día/hembra	Desviación estándar	Error estándar	<i>prueba-t(p)</i>
BSB_hb-1	14.05	78	0.83	0.83	0.213	2.48E-13*
YFPv2	83.61	770	5.72	1.21	0.311	

* indica diferencia significativa (p-valor ≤ 0.05)

20

Ejemplo 7: *Zea mays* transgénica que comprende secuencias de la plaga de hemípteros

25

De diez a 20 plantas transgénicas *Zea mays* T₀ que albergan los vectores de expresión para los ácidos nucleicos que comprenden la SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO:2 son generadas tal como se describe en el EJEMPLO 3. Un adicional de 10 a 20 líneas

independientes de *Zea mays* T₁ que expresan el ARNdh horquillado para un constructo de iARN son obtenidas para la prueba de exposición de BSB. Los ARNdh horquillados son derivados que comprenden la SEQ ID 1. Éstos son confirmados a través de RT-PCR
5 u otros métodos de análisis molecular. Las preparaciones de ARN Total de las líneas independientes T₁ seleccionadas son opcionalmente utilizadas para RT-PCR con los cebadores diseñados para enlazarse en el enlazador del casete de expresión de la horquilla en cada uno de los constructos de iARN. En adición, los
10 cebadores específicos para cada gen objetivo en un constructo de iARN son opcionalmente utilizados para amplificar y confirmar la producción del ARNm pre-procesado requerido para la producción del ARNip *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión del ARN horquillado en cada
15 planta transgénica *Zea mays*. El procesamiento del ARNdh horquillado de los genes objetivo en ARNip es posteriormente de manera opcional confirmado en líneas transgénicas independientes utilizando las hibridaciones de transferencia de ARN.

De igual manera, las moléculas de la iARN que tienen
20 secuencias de discrepancia con más de 80% de identidad de secuencia a los genes objetivo afectan los hemípteros en una manera similar a aquélla apreciada con las moléculas de la iARN que tiene 100% de identidad de secuencia a los genes objetivo. El emparejamiento de la secuencia de discrepancia con las secuencias
25 nativas para formar un ARNdh horquillado en el mismo constructo de

iARN libera los ARNip procesados por la planta con capacidad de afectar el crecimiento, desarrollo, y viabilidad de alimentación de las plagas de hemípteros.

El suministro *in planta* de ARNdh, ARNip, ARNhc, ARNhp, o
 5 miARN que corresponde a los genes objetivo y la posterior captación por parte de las plagas de hemípteros a través de la alimentación resulta en la regulación a la baja de los genes objetivo en la plaga de hemípteros a través del silenciamiento del gen mediado por ARN. Cuando la función de un gen objetivo es importante para una o más
 10 etapas de desarrollo, el crecimiento, desarrollo, y/o reproducción de la plaga de hemípteros es afectado, y en el caso de por lo menos uno de *Euschistus heros*, *Piezodorus guildinii*, *Halyomorpha halys*, *Nezara viridula*, *Acrosternum hilare*, y *Euschistus servus* conduce a la falla para exitosamente infestar, alimentar, desarrollar, y/o
 15 reproducir, o conduce a la eliminación de la plaga de hemípteros. La elección de los genes objetivo y el éxito de la aplicación de la iARN son luego utilizadas para el control de las plagas de hemípteros.

Comparación fenotípica de las líneas transgénicas de la iARN y
Zea mays no transformada. Los genes objetivo de la plaga de
 20 hemípteros o las secuencias seleccionadas para crear el ARNdh horquillado no tienen similitud con ninguna secuencia de gen de planta conocida. Por consiguiente, no es esperado que la producción o la activación de la ARNi (sistémica) por los constructos dirigidos a estos genes o secuencias de la plaga de hemípteros tendrán algún
 25 efecto nocivo sobre las plantas transgénicas. Sin embargo, las

características de desarrollo y morfológicas de las líneas transgénicas son comparadas con las plantas no transformadas, así como también aquéllas de líneas transgénicas transformadas con un vector “vacío” que no tiene gen que expresa la horquilla. Las

5 características de raíz, brote, follaje y reproducción de la planta son comparadas. No hay diferencia observable en la longitud de la raíz y los patrones de crecimiento de las plantas transgénicas y no transformadas. Las características de los brotes de la planta tal como altura, cantidades y tamaños de las hojas, tiempo de

10 florecimiento, tamaño y apariencia de las flores son similares. En general, no hay diferencias morfológicas observables entre las líneas transgénicas y aquéllas sin la expresión de las moléculas de ARNi objetivo cuando se cultivan *in vitro* y en la tierra en el invernadero.

Ejemplo 8: *Glycine max* transgénica que comprende secuencias

15 **de la plaga de hemípteros**

De diez a 20 plantas transgénicas *Glycine max* T₀ que albergan los vectores de expresión para los ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID NO:2, o un segmento SEQ ID NO:1 son generadas como es conocido en el arte, incluyendo por ejemplo, mediante transformación

20 mediada por *Agrobacterium*, como a continuación. Las semillas de frijol de soya maduro (*Glycine max*) son esterilizadas durante la noche con gas cloro por dieciséis horas. A continuación de la esterilización con gas cloro, las semillas son colocadas en un recipiente abierto en una campana de flujo LAMINAR™ para disipar

25 el gas cloro. A continuación, las semillas esterilizadas son

embebidas con H₂O estéril por dieciséis horas en la oscuridad utilizando una caja negra a 24 °C.

Preparación de los frijoles de soya de grano partido. El grano partido del frijol de soya que comprende una porción de un protocolo de eje embrionario requiere la preparación del material de semilla del frijol de soya que se corta en dirección longitudinal, utilizando una cuchilla #10 fijada a un escalpelo, a lo largo del hilo de la semilla para separar y remover la cubierta de la semilla, y para separar la semilla en las dos secciones del cotiledón. Se debe tener una cuidadosa atención de remover parcialmente el eje embrionario, en donde aproximadamente 1/2 – 1/3 del eje embrionario permanece unido al extremo nodal del cotiledón.

Inoculación. Los granos partidos del frijol de soya que comprenden una porción parcial del eje embrionario son entonces sumergidos por aproximadamente 30 minutos en una solución de *Agrobacterium tumefaciens* (por ejemplo, la cepa EHA 101 o EHA 105) que contiene plásmido binario que comprende la SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO:2. La solución de *A. tumefaciens* es diluida hasta una concentración final de $\lambda=0,6$ OD₆₅₀ antes de sumergir los cotiledones que comprenden el eje embrionario.

Co-cultivo. A continuación de la inoculación, el grano partido del frijol de soya es permitido de co-cultivarse con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* por 5 días en un medio de co-cultivo (*Agrobacterium* Protocols, vol. 2, 2^{da} Ed., Wang, K. (Ed). Humana Press, Nueva Jersey, 2006) en una caja Petri cubierta con una pieza

de papel de filtro.

Inducción del brote. Después de 5 días de co-cultivo, los granos partidos del frijol de soya son lavados en medios de Inducción de brote (SI) líquidos que consisten de sales B5, vitaminas B5, 28 mg/L de Hierro, 38 mg/L de Na₂EDTA, 30 g/L de sacarosa, 0.6 g/L de MES, 1.11 mg/L de BAP, 100 mg/L de TIMENTIN®, 200 mg/L de cefotaxima, y 50 mg/L de vancomicina (pH 5.7). Los granos partidos del frijol de soya son entonces cultivados en el medio de Inducción de brote I (SI I) que consiste de sales B5, vitaminas B5, 7 g/L de Agar noble, 28 mg/L de Hierro, 38 mg/L de Na₂EDTA, 30 g/L de sacarosa, 0.6 g/L de MES, 1.11 mg/L de BAP, 50 mg/L de TIMENTIN®, 200 mg/L de cefotaxima, 50 mg/L de vancomicina (pH 5.7), con el lado plano del cotiledón mirando hacia arriba y el extremo nodal del cotiledón incorporado en el medio. Después de 2 semanas de cultivo, los explantes del grano partido del frijol de soya transformado son transferidos al medio de Inducción de brote II (SI II) que contiene SI I medio complementado con 6 mg/L de glufosinato (LIBERTY®).

Elongación del brote. Después de 2 semanas de cultivo en el medio SI II, los cotiledones son removidos de los explantes y una almohadilla de nivelación de brote que contiene el eje embrionario es extirpada al realizar un corte a la base del cotiledón. La almohadilla de brote aislada del cotiledón es transferida al medio de Alargamiento de brote (SE). El medio SE consiste de sales MS, 28 mg/L de Hierro, 38 mg/L de Na₂EDTA, 30 g/L de sacarosa y 0.6 g/L

de MES, 50 mg/L de asparagina, 100 mg/L de ácido L-piroglutámico, 0.1 mg/L de IAA, 0.5 mg/L de GA3, 1 mg/L de zeatina ribósido, 50 mg/L de TIMENTIN®, 200 mg/L de cefotaxima, 50 mg/L de vancomicina, 6 mg/L de glufosinato, 7 g/L de Agar noble, (pH 5.7).

- 5 Los cultivos son transferidos a medio fresco SE cada 2 semanas. Los cultivos son desarrollados en una cámara de desarrollo CONVIRON® a 24 °C con un fotoperiodo de 18 h a una intensidad de luz de 80 a 90 $\mu\text{mol/m}^2\text{sec}$.

Enraizamiento. Los brotes alargados que se desarrollan desde la almohadilla de brote del cotiledón son aislados al cortar el brote alargado a la base de la almohadilla de brote del cotiledón, y sumergiendo el brote alargado en 1 mg/L de IBA (ácido Indol 3-butírico) por 1 a 3 minutos para promover el enraizamiento. A continuación, los brotes alargados son transferidos al medio de enraizamiento (sales MS, vitaminas B5, 28 mg/L de Hierro, 38 mg/L de Na_2EDTA , 20 g/L de sacarosa y 0.59 g/L de MES, 50 mg/L de asparagina, 100 mg/L de ácido L-piroglutámico 7 g/L de Agar noble, pH 5,6) en bandejas *phytatrays*.

Cultivo. A continuación del cultivo en una cámara de desarrollo CONVIRON® a 24 °C, fotoperiodo de 18 h, por 1 a 2 semanas, los brotes que han desarrollado raíces son transferidos a una mezcla de tierra en una copa de helados cubierta y colocados en una cámara de desarrollo CONVIRON® (modelos CMP4030 y CMP3244, Controlled Enviroments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) bajo condiciones de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a

una intensidad de luz de 120 a 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ bajo temperatura constante (22 °C) y humedad (40 a 50%) para la climatización de las plántulas. Las plántulas enraizadas son aclimatadas en copas de helados por varias semanas antes de que ellas sean transferidas al
5 invernadero para climatización adicional y el establecimiento de plantas transgénicas de frijol de soya robustas.

Un adicional de 10 a 20 líneas independientes de *Glycine max* T₁ que expresan ARNdh horquillado para un constructo de iARN son obtenidas para la prueba de exposición con BSB. El ARNdh
10 horquillado puede ser derivado según se establece en SEQ ID NO:2 o de otro modo comprenda además SEQ ID NO:1. Éstas son confirmadas a través de RT-PCR u otros métodos de análisis molecular como es conocido en el arte. Las preparaciones de ARN Total de las líneas independientes T₁ seleccionadas son
15 opcionalmente utilizadas para RT-PCR con los cebadores diseñados para enlazarse en el enlazador del casete de expresión de la horquilla en cada uno de los constructos de iARN. En adición, los cebadores específicos para cada gen objetivo en un constructo de iARN son opcionalmente utilizados para amplificar y confirmar la
20 producción de ARNm pre-procesado requerido para la producción de ARNip *in planta*. La amplificación de las bandas deseadas para cada gen objetivo confirma la expresión del ARN horquillado en cada planta transgénica *Glycine max*. El procesamiento del ARNdh horquillado de los genes objetivo en ARNip es posteriormente de
25 manera opcional confirmado en líneas transgénicas independientes

utilizando las hibridaciones de transferencia de ARN.

Las moléculas de la iARN que tienen secuencias de discrepancia con más de 80% de identidad de secuencia a los genes objetivo afectan la BSB en una manera similar a aquélla apreciada
 5 con las moléculas de iARN que tienen 100% de identidad de secuencia a los genes objetivo. El emparejamiento de secuencia de discrepancia con secuencias nativas para formar un ARNdh horquillado en el mismo constructo de iARN libera los ARNip procesados de planta con capacidad de afectar el crecimiento,
 10 desarrollo, y viabilidad de alimentación de las plagas de hemípteros.

El suministro *in planta* del ARNdh, ARNip, ARNhc, o miARN que corresponde a los genes objetivo y la posterior captación por parte de las plagas de hemípteros a través de la alimentación resulta en la regulación a la baja de los genes objetivo en la plaga de
 15 hemípteros a través del silenciamiento del gen mediado por ARN. Cuando la función de un gen objetivo es importante para una o más etapas de desarrollo, el crecimiento, desarrollo, y/o supervivencia de la plaga de hemípteros es afectado, y en el caso de por lo menos uno de *Euschistus heros*, *Piezodorus guildinii*, *Halyomorpha halys*,
 20 *Nezara viridula*, *Acrosternum hilare*, y *Euschistus servus*, conduce a la falla para exitosamente infestar, alimentar, y/o desarrollar, o conduce a la eliminación de la plaga de hemípteros. La elección de los genes objetivo y el éxito de la aplicación de la iARN es luego utilizada para el control de las plagas de hemípteros.

25 Comparación fenotípica de las líneas transgénicas iARN y

Glycine max no transformada. Los genes o secuencias objetivo de la plaga de hemípteros seleccionada para crear el ARNdh horquillado no tienen similitud con ninguna secuencia conocida del gen de la planta. Por consiguiente no es esperado que la producción o la

5 activación de la iARN (sistémica) mediante constructos dirigidos a estos genes o secuencias de la plaga de hemípteros tenga algún efecto nocivo sobre las plantas transgénicas. Sin embargo, las características de desarrollo y morfológicas de las líneas transgénicas son comparadas con las plantas no transformadas, así

10 como también aquéllas de las líneas transgénicas transformadas con un vector de “vacío” que no tiene el gen que expresa la horquilla. Las características de raíz, brote, follaje y reproducción de la planta son comparadas. No hay diferencia observable en la longitud de la raíz y los patrones de crecimiento de las plantas transgénicas y no

15 transformadas. Las características de los brotes de la planta tal como altura, cantidades y tamaños de las hojas, tiempo de florecimiento, tamaño y apariencia de las flores son similares. En general, no hay diferencias morfológicas observables entre las líneas transgénicas y aquéllas sin la expresión de las moléculas de ARNi

20 objetivo cuando se cultivan *in vitro* y en la tierra en el invernadero.

Ejemplo 9: Bioensayos con *E. heros* en dieta artificial.

En los ensayos *Hunchback* de alimentación de ARNdh en la dieta artificial, las bandejas de 32 pozos son fijadas con un granulado de dieta artificial de ~18 mg y agua, como para los

25 experimentos de inyección. El ARNdh a una concentración de 200

ng/ μ L es agregado al granulado de alimentación y muestra de agua; 100 μ L a cada uno de dos pozos. Cinco ninfas de *E. heros* de 2^{do} estadio son introducidas en cada uno de los pozos. Las muestras de agua y ARNdh que tienen como objetivo el transcrito YFP se utilizan
 5 como controles negativos. Los experimentos son repetidos en tres días diferentes. Los insectos supervivientes son pesados, y las tasas de mortalidad son determinadas después de 7 días de tratamiento.

Los bioensayos de alimentación en *E. heros* hembra adulta se realizan en bandejas de 32 receptáculos tal como se describe
 10 anteriormente. Las hembras apareadas jóvenes (menos de una semana de etapa adulta) se introducen en las bandejas de bioensayo con dieta artificial, una por bandeja. Después de 7 días de exposición a ARNdh hasta diez hembras adultas se trasladan a contenedores con ejotes, agua, semillas y dos machos. La viabilidad
 15 de las hembras así como los números de huevos de ovoposición y los huevos incubados se registraron para las siguientes dos semanas. Los datos muestran que los números de huevos de ovoposición y/o incubados fueron significativamente reducidos.

**Ejemplo 10: *Arabidopsis thaliana* transgénica que comprende
 20 secuencias de la plaga de hemípteros**

Los vectores de transformación de *Arabidopsis* que contienen un constructo de gen objetivo para la formación de la horquilla que comprende segmentos de *Hunchback* (SEQ ID NO:1) son generados utilizando los métodos moleculares estándares similares al EJEMPLO
 25 4. La transformación de *Arabidopsis* es llevada a cabo utilizando el

procedimiento estándar basado en *Agrobacterium*. Las semillas T₁ son seleccionadas con el marcador seleccionable de tolerancia al glufosinato. Las plantas transgénicas de *Arabidopsis* T₁ son generadas y las plantas transgénicas T₂ homocigóticas de copia simple son generadas para los estudios de insectos. Los bioensayos son llevados a cabo en plantas *Arabidopsis* que están creciendo con inflorescencias. De cinco a diez insectos son colocados en cada una de las plantas y monitoreados por su supervivencia dentro de 14 días.

10 Construcción de vectores de transformación de *Arabidopsis*.

Los clones de entrada basados en el vector de entrada que alberga un constructo de gen objetivo para la formación de la horquilla que comprende un segmento de *Hunchback*(SEQ ID NO:1) se ensamblan utilizando una combinación de fragmentos químicamente sintetizados (DNA2.0, Menlo Park, CA) y métodos moleculares estándares de clonación. La formación intramolecular de la horquilla mediante transcritos primarios de ARN se facilita mediante la disposición (dentro de una sola unidad de transcripción) de dos copias de un segmento de gen objetivo en orientaciones opuestas, los dos segmentos que están siendo separados mediante una secuencia enlazadora (por ejemplo, intrón ST-LS1; SEQ ID NO:6) (Vancanneyt *et al.* (1990) Mol. Gen. Genet. 220(2):245-50). De esta manera, el transcrito primario de ARNm contiene las dos secuencias *Hunchback* del segmento de gen como grandes repeticiones invertidas una de otra, separadas por la secuencia enlazadora. Una copia de un

promotor (por ejemplo, promotor de ubiquitina 10 *Arabidopsis thaliana* (Callis *et al.* (1990) J. Biological Chem. 265:12486-12493)) se utiliza para activar la producción del transcrito primario de ARNm horquillado, y un fragmento que comprende una región 3' no

5 traducida del Marco de lectura abierto 23 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3' UTR v1; Patente Estadounidense No. 5,428,147) se utilizan para terminar la transcripción del gen que expresa el ARN horquillado.

Los clones de horquilla dentro de los vectores de entrada se

10 utilizan en reacciones de recombinación estándares GATEWAY® con un vector destino binario para producir los vectores de transformación de expresión de ARN horquillado para la transformación mediada por *Arabidopsis* de *Agrobacterium*.

El vector de destino binario comprende un gen de tolerancia a

15 los herbicidas, DSM-2v2 (Solicitud de Patente Estadounidense No. 2011/0107455), bajo la regulación de un promotor del Virus del Mosaico de la Vena de la Yuca (Promotor CsVMV v2, Patente Estadounidense No. 7,601,885; Verdaguer *et al.* (1996) Plant Mol. Biol. 31:1129-39). Un fragmento que comprende una región 3' no

20 traducida del Marco de lectura abierto 1 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3' UTR v6; Huang *et al.* (1990) J. Bacteriol. 172:1814-22) se utiliza para terminar la transcripción del ARNm DSM2v.

Un constructo binario de control negativo que comprende un

25 gen que expresa un ARN YFP de horquilla, es construido por medio

de reacciones de recombinación estándares GATEWAY® con un vector destino binario típico y el vector de entrada. El constructo de entrada comprende una secuencia YFP horquilla (hpYFP v2-1, SEQ ID NO:5) bajo el control de expresión de un promotor Ubiquitina 10

5 *Arabidopsis* (tal como se indica en líneas previas) y un fragmento que comprende un ORF23 región 3' no traducida de *Agrobacterium tumefaciens* (tal como se indica en líneas previas).

Producción de *Arabidopsis* transgénica que comprende ARN horquillados insecticidas: transformación mediada por

10 *Agrobacterium*. Los plásmidos binarios que contienen secuencias de horquilla son electroporados en la cepa *Agrobacterium* GV3101 (pMP90RK). Los clones recombinantes de *Agrobacterium* son confirmados mediante análisis de restricción de preparaciones de plásmidos de las colonias recombinantes *Agrobacterium*. Un Kit

15 Qiagen Plasmid Max (Qiagen, Cat# 12162) se utiliza para extraer los plásmidos de los cultivos de *Agrobacterium* siguiendo el protocolo recomendado del fabricante.

Transformación de *Arabidopsis* y selección de T₁. De doce a quince plantas de *Arabidopsis* (c.v. Columbia) son desarrolladas en

20 macetas de 4" en el invernadero con intensidad de luz de 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 25 °C, y condiciones de 18:6 horas de luz:oscuridad. Los tallos de flores primarias son recortados una semana antes de la transformación. Los inóculos de *Agrobacterium* son preparados al incubar 10 μL de solución patrón en glicerol de *Agrobacterium*

25 recombinante en 100 mL de caldo LB (Sigma L3022) +100 mg/L de

Espectinomycin + 50 mg/L de Kanamicina a 28 °C y agitando a 225 rpm por 72 horas. Las células de *Agrobacterium* son recolectadas y suspendidas en solución de 5% sacarosa + 0.04% Silwet-L77 (Lehle Seeds Cat # VIS-02) +10 µg/L de benzamino purina (BA) a OD₆₀₀ 0.8~1.0 antes de la inmersión floral. Las partes sobre la tierra de la planta son sumergidas en la solución de *Agrobacterium* por 5 a 10 minutos, con agitación moderada. Las plantas son entonces transferidas al invernadero para el desarrollo normal con suministro regular de agua y fertilización hasta que la semilla empiece a crecer.

10 **Ejemplo 11: Crecimiento y bioensayos de *Arabidopsis* transgénica**

Selección de *Arabidopsis* T₁ transformada con constructos de horquillados de la iARN. Hasta 200 mg de semillas T₁ de cada transformación son estratificadas en 0.1% de solución de agarosa. Las semillas son plantadas en bandejas de germinación (10.5" x 21" x 1"; T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN) con medios de iluminación solar #5. Los transformantes son seleccionados por su tolerancia a Ignite® (glufosinato) a 280 g/ha a 6 y 9 días post plantación. Los eventos seleccionados son trasplantados en macetas de 4" de diámetro. El análisis de la copia de inserción es llevada a cabo dentro de una semana del trasplante mediante PCR cuantitativo en Tiempo Real (qPCR) por hidrólisis utilizando Roche LIGHTCYCLER® 480. Los cebadores PCR y las sondas de hidrólisis son diseñados contra el marcador seleccionable DSM2v2 utilizando el Software LIGHTCYCLER® Probe Design 2.0 (Roche). Las plantas son

mantenidas a 24 °C, con un fotoperiodo de 16:8 horas luz:oscuridad bajo luces fluorescentes e incandescentes a una intensidad de 100 a 150 mE/m²s.

Bioensayo de alimentación de planta con ninfa *E. heros*. Por lo
 5 menos cuatro eventos de copia baja (1 a 2 inserciones), cuatro de copia media (2 a 3 inserciones), y cuatro de copia elevada (≥ 4 inserciones) son seleccionados para cada constructo. Las plantas son desarrolladas hasta una etapa reproductiva (plantas que contienen flores y silicuas). La superficie de la tierra está cubierta
 10 con ~ 50 mL de volumen de arena blanca para la fácil identificación de los insectos. De cinco a diez ninfas de 2^{do} estadio de *E. heros* son introducidas en cada una de las plantas. Las plantas son cubiertas con tubos plásticos que son de 3" en diámetro, 16" de altura, y con un espesor de pared de 0.03" (Ítem No. 484485, Visipack Fenton
 15 MO); los tubos son cubiertos con malla de nailon para aislar los insectos. Las plantas son mantenidas bajo condiciones normales de temperatura, luz, y suministro de agua en un ambiente Conviron. En 14 días, los insectos son recolectados y pesados; la mortalidad porcentual así como también la inhibición del crecimiento (1 –
 20 tratamiento peso / control peso) son calculadas. Las plantas que expresan YFP horquilla se utilizan como controles.

Plantas T1 de *Arabidopsis* pARNi son seleccionadas y desarrolladas en invernadero, tal como se describe anteriormente. De uno a 5 adultos de BSB recién emergidos son liberados en cada
 25 planta y la planta completa se cubre tal como se describe

anteriormente para impedir que los adultos escapen. Una semana después de la liberación, los adultos hembra son recuperados de cada planta y se mantienen en el laboratorio para recolección de huevos. Dependiendo del objetivo de ARNi parental y el fenotipo
 5 esperado, los parámetros tales como número de huevos por hembra, porcentaje de incubación de huevos y mortalidad de ninfas se registran y comparan con las plantas de control.

Generación de semillas de *Arabidopsis* T₂ y bioensayos T₂. Las semillas T₂ son producidas a partir de eventos de copia baja
 10 seleccionados (1 a 2 inserciones) para cada constructo. Las plantas (homocigóticas y/o heterocigóticas) son sometidas a bioensayo de alimentación con ninfas y adultos de *E. heros*, tal como se describe en líneas previas. Las semillas T₃ son recolectadas de los homocigotes y almacenadas para el análisis futuro.

15 **Ejemplo 12: Transformación de especies de cultivo adicionales**

El algodón es transformado con *Hunchback* (con o sin un péptido de tránsito del cloroplasto) para proveer el control de los insectos hemípteros mediante la utilización de un método conocido por aquéllas personas expertas en el arte, por ejemplo,
 20 sustancialmente las mismas técnicas previamente descritas en el EJEMPLO 14 de la Patente Estadounidense No. 7,838,733, o el Ejemplo 12 de la Publicación de Patente Internacional PCT No. WO 2007/053482.

Ejemplo 13: Protección de insectos mediada por pARNi

25 ARNi parental que causa la mortalidad o pérdida de viabilidad

de huevos produce más beneficios de durabilidad a los cultivos transgénicos que usan ARNi y otros mecanismos para protección de insectos. Se utilizó un modelo de dos parches básico para demostrar esta utilidad.

5 Un parche contenía un cultivo transgénico que expresaba ingredientes insecticidas, y el segundo parche contenía un cultivo refugio que no expresaba ingredientes insecticidas. Los huevos fueron ovipositados en los dos parches modelados de acuerdo con sus proporciones relativas. En este ejemplo, el parche transgénico
10 representó el 95% del paisaje, y el parche refugio representó el 5%. El cultivo transgénico expresó una proteína insecticida contra el insecto.

La plaga con la proteína insecticida se modeló como monogénica, con dos posibles alelos; uno (S) que confería
15 susceptibilidad, y el otro ® que confería resistencia. La proteína insecticida se modeló para producir el 97% de mortalidad de ninfas susceptibles (SS) homocigóticas que se alimentan de ella. Se supuso que un hubo mortalidad de ninfas que son homocigóticas con respecto a alelos de resistencia (RR). La resistencia a la proteína
20 insecticida se consideró incompletamente recesiva, con lo cual el dominio funcional es 0,3 (hay 67,9% de mortalidad de ninfas que son heterocigóticas (RS) con respecto a resistencia a la proteína que se alimenta del cultivo transgénico).

El cultivo transgénico también expresó ARNdh parentalmente
25 activo que, a través de interferencia de ARN (pARNi), hace que los

huevos de insectos hembra adultos que se exponen al cultivo transgénico sean no viables. La resistencia de insectos a pARNi también se consideró monogénica con dos alelos posibles; uno (X) que confiere susceptibilidad a la hembra adulta a ARNi y el otro (Y) que confiere resistencia a la hembra adulta a ARNi. Suponiendo un alto nivel de exposición a los ARNdh, el pARNi se modeló para hacer que el 99.9% de los huevos producidos por hembra susceptible homocigótica (XX) sean no viables. El modelo supuso que pARNi no tiene efecto sobre la viabilidad de huevos producidos por hembras resistentes homocigóticas (YY). La resistencia a ARNds se consideró recesiva, con lo cual el dominio funcional es 0.01 (98.9% de huevos producidos por la hembra que es heterocigótica (XY) para resistencia a ARNdh son no viables).

En el modelo, hubo apareamiento aleatorio entre los adultos sobrevivientes y ovoposición aleatoria a través de los dos parches de acuerdo con sus proporciones relativas. Las frecuencias genotípicas de progenie viable siguió la genética de Mendel para un sistema genético de dos lugares.

El efecto de pARNi requirió que las hembras adultas se alimenten de tejido de plantas que expresaban ARNdh activo parental. La interferencia con el desarrollo de huevos puede ser más bajo para hembras adultas que emergen del cultivo refugio que del cultivo transgénico; los adultos pueden alimentarse más ampliamente en el parche en donde emergen después del desarrollo de ninfas. Por lo tanto, la magnitud relativa del efecto de pARNi en adultos

hembra que emergieron del parche de refugio fue variada, con la proporción del efecto de pARNi en el orden desde 0 (sin efecto de pARNi en hembras adultas que emergieron del parche de refugio) a 1 (igual efecto de pARNi en hembras adultas que emergieron del parche de refugio como en hembras adultas que emergieron del parche transgénico).

Este modelo podría ser fácilmente ajustado para demostrar la situación cuando el efecto de pARNi es también o alternatively alcanzado mediante la alimentación de machos adultos con tejido de tejidos de plantas que expresan ARNdh activo parental.

Las frecuencias de los dos alelos de resistencia se calcularon a través de generaciones. Las frecuencias iniciales de ambos alelos de resistencia (R e Y) se supusieron en 0.005. Los resultados se presentaron como el número de generaciones de insectos para las frecuencias de cada uno de los alelos de resistencia a llegar a 0.05. Para examinar el retardo de resistencia causado por pARNi, las simulaciones que incluyeron pARNi se compararon con las simulaciones que no incluyeron pARNi, pero que eran idénticas en cualquier otra forma. **FIG. 2.**

El modelo fue también modificado para incluir ARNdh de interferencia active con ninfas en combinación con la proteína insecticida en el cultivo transgénico. Allí, al ARNi de ninfa se le asignó un efecto del 97% de mortalidad de ninfas con respecto a la ninfa ARNi-susceptible homocigótica (genotipo XX), y ningún efecto a la ninfa que era ARNi-resistente y homocigótica. Hubo un 67.9% de

mortalidad de ninfas que eran heterocigóticas para resistencia de ARNi (XY). Se supuso que el mismo mecanismo de resistencia aplicada tanto a ARNi activo en ninfas como pARNi. Como antes, el efecto de pARNi en adultos hembras que emergieron del parche de refugio con relación al efecto sobre adultos hembras que emergieron del parche transgénico varió de 0 a 1. Del mismo modo, para examinar el retardo de resistencia causado por pARNi, las simulaciones que incluyeron pARNi se compararon con las simulaciones que no incluyeron pARNi, pero que fueron idénticos en cualquier otra forma (incluyendo ARNi de ninfas) **FIG. 3.**

Se observa un claro beneficio de manejo de resistencia de pARNi cuando la magnitud del efecto de pARNi en viabilidad de huevos para adultos hembras que emergieron del parche de refugio se redujo en comparación con la magnitud del efecto para adultos que emergieron del parche transgénico. Los cultivos transgénicos que produjeron ARNdh activo parental además de la proteína insecticida fueron mucho más durables en comparación con cultivos transgénicos que produjeron solamente una proteína insecticida. En forma similar, los cultivos transgénicos que produjeron ARNdh activo parental además de tanto una proteína insecticida y un ARNdh activo en ninfas fueron mucho más duraderos en comparación con los cultivos transgénicos que produjeron solamente una proteína insecticida y un ARNdh activo en ninfas. En el último caso, el beneficio de durabilidad se aplicó tanto a la proteína insecticida como al ARNdh de interferencia insecticida.

Ejemplo 14: Plantas transgénicas que comprenden una secuencia de plaga de hemípteros y constructos de iARN adicionales

Una planta transgénica *Zea mays* que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que es transcrita en una molécula de ARNi que tiene como objetivo un organismo de la plaga de hemípteros es secundariamente transformada mediante las metodologías de *Agrobacterium* o WHISKERS™ (ver Petolino y Arnold (2009) Methods Mol. Biol. 526:59-67) para producir una o más moléculas de proteína insecticida (por ejemplo, por lo menos una molécula de ARNdH que incluye una molécula de ARNdH que objetiva un gen que comprende SEQ ID NO:1). Los vectores de plásmido de transformación de plantas preparados esencialmente tal como se describe en el EJEMPLO 3 son administrados mediante los métodos de transformación mediados por *Agrobacterium* o WHISKERS™ en células en suspensión de maíz dulce o embriones inmaduros obtenidos de una planta transgénica que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que es transcrita en una molécula de ARNi que tiene como objetivo un organismo de la plaga de hemípteros.

Ejemplo 15: Plantas transgénicas que comprenden un constructo iARN y secuencias de control de la plaga de hemípteros adicionales

Una planta transgénica que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que es transcrita en una molécula de ARNi que tiene como objetivo un organismo de la plaga

de hemípteros (por ejemplo, por lo menos una molécula de ARNdh incluyendo una molécula de ARNdh dirigido a un gen que comprende la SEQ ID NO:1) es secundariamente transformada mediante las metodologías de *Agrobacterium* o WHISKERS™ (ver Petolino y Arnold (2009) Methods Mol. Biol. 526:59-67) para producir una o más moléculas de proteína insecticida, por ejemplo, las proteínas insecticidas Cry1A, Cry2A, Cry3A y Cry11A o Cry51. Los vectores de plásmido de transformación de plantas preparados esencialmente tal como se describe en el EJEMPLO 3 son administrados mediante los métodos de transformación mediados por *Agrobacterium* o WHISKERS™ en células en suspensión o embriones inmaduros obtenidos de una planta transgénica que comprende una secuencia codificante heteróloga en su genoma que es transcrita en una molécula de ARNi que tiene como objetivo un organismo de la plaga de hemípteros. Las plantas doblemente transformadas son obtenidas de manera que producen las moléculas de ARNi y las proteínas insecticidas para el control de las plagas de hemípteros.