

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 696**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/31** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2005 E 05777174 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 1732379**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de control de infestaciones de insectos en plantas**

30 Prioridad:

**09.04.2004 US 560842 P**

**27.04.2004 US 565632 P**

**11.06.2004 US 579062 P**

**20.08.2004 US 603421 P**

**11.10.2004 US 617261 P**

**07.04.2005 US 669175 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.01.2014**

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)  
800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD, MAIL  
CODE E2NA  
ST. LOUIS, MO 63137, US**

72 Inventor/es:

**BAUM, JAMES A.;  
GILBERTSON, LARRY A.;  
KOVALIC, DAVID K.;  
LAROSA, THOMAS J.;  
LU, MAOLONG;  
MUNYIKWA, TICHAFI R. I.;  
ROBERTS, JAMES K.;  
WU, WEI y  
ZHANG, BEI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 439 696 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos de control de infestaciones de insectos en plantas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere, en general, al control genético de infestaciones de plagas en plantas y en y sobre animales. Más específicamente, la presente invención se refiere a los procedimientos para modificar la expresión endógena de secuencias codificantes en la célula o tejido de una plaga particular. Más específicamente, la presente invención utiliza tecnologías de ADN recombinante para reprimir o inhibir postranscripcionalmente la expresión de una secuencia codificante diana en la célula de una plaga, alimentando a la plaga una o más moléculas de ácido ribonucleico (ARN) bicatenario o interferente pequeño transcrito a partir de toda o una parte de una secuencia codificante diana, controlándose así la infestación. Por tanto, la presente invención se refiere a inhibición específica de secuencias de expresión de secuencias codificantes usando ARN bicatenario (ARNb) o ARN interferente pequeño (ARNip) para lograr los niveles previstos de control de plagas.

15 También se proporcionan novedosas moléculas de ácidos nucleicos aisladas y sustancialmente purificadas que incluyen, pero no se limitan a, secuencias de nucleótidos y construcciones de ADN recombinante que no se producen naturalmente para transcribir las moléculas de ARNb o ARNip de la presente invención que suprimen o inhiben la expresión de una secuencia codificante endógena o una secuencia codificante diana en la plaga cuando se introduce en la misma. También se proporcionan plantas transgénicas que (a) contienen secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas de ácidos nucleicos aisladas y sustancialmente purificadas y las construcciones de ADN recombinante que no se producen naturalmente para transcribir las moléculas de ARNb o ARNip para controlar infestaciones de plagas en plantas, y (b) muestran resistencia y/o tolerancia potenciada a las infestaciones de insectos. También se describen composiciones que contienen las secuencias de nucleótidos de ARNb de la presente invención para su uso en aplicaciones tóxicas sobre plantas o sobre animales o en el entorno de un animal para lograr la eliminación o reducción de infestación de plagas.

**Antecedentes de la invención**

25 El entorno en el que los seres humanos viven está repleto de infestación de plagas. Plagas que incluyen insectos, arácnidos, crustáceos, hongos, bacterias, virus, nematodos, platelmintos, ascárides, oxiuros, anquilostomas, tenias, tripanosomas, esquistosomas, éstridos, pulgas, garrapatas, ácaros y piojos son ubicuas en el entorno humano, y se ha utilizado una multitud de medios para intentar controlar infestaciones por estas plagas. Las composiciones para controlar infestaciones de plagas microscópicas tales como bacterias, hongos y virus se han proporcionado en forma de composiciones de antibiótico, composiciones antivirales y composiciones antifúngicas. Las composiciones para controlar infestaciones de plagas mayores tales como nematodos, platelminto, ascárides, oxiuros, gusanos del corazón, tenias, tripanosomas y esquistosomas han sido normalmente en forma de composiciones químicas que pueden tanto aplicarse a las superficies de sustratos sobre las que se sabe que infestan las plagas, como ser ingeridas por un animal infestado en forma de pellas, polvos, comprimidos, pastas o cápsulas. La presente invención se refiere a proporcionar un medio mejorado para controlar la infestación de plagas en comparación con las composiciones conocidas en la técnica.

35 Los cultivos comerciales son frecuentemente las dianas de ataque de los insectos. Se ha hecho sustancial progreso en las últimas décadas hacia desarrollar procedimientos y composiciones más eficaces para controlar infestaciones de insectos en plantas. Los pesticidas químicos han sido muy eficaces en erradicar infestaciones de plagas. Sin embargo, hay varias desventajas de usar agentes pesticidas químicos. Los agentes pesticidas químicos no son selectivos. Las aplicaciones de pesticidas químicos están previstas para controlar plagas de invertebrados que son perjudiciales para diversos cultivos y otras plantas. Sin embargo, debido a la falta de selectividad, los agentes pesticidas químicos también ejercen sus efectos sobre fauna no diana, esterilizando frecuentemente eficazmente un campo durante un periodo de tiempo sobre el que se han aplicado los agentes pesticidas. Los agentes pesticidas químicos persisten en el entorno y generalmente son de metabolización lenta, si lo son. Se acumulan en la cadena alimentaria, y particularmente en especies de predadores superiores. Las acumulaciones de estos agentes pesticidas químicos produce el desarrollo de resistencia a los agentes y en especies superiores hasta la cadena evolutiva, actúan de mutágenos y/o carcinógenos causando frecuentemente modificaciones genéticas irreversibles y perjudiciales. Así, ha habido una necesidad que se sentía desde hace tiempo por procedimientos respetuosos con el medioambiente para controlar o erradicar infestación de insectos sobre o en plantas, es decir, procedimientos que sean selectivos, medioambientalmente inertes, no persistentes y biodegradables, y que se ajusten bien en los esquemas de gestión de resistencia de plagas.

50 Las composiciones que incluyen bacterias *Bacillus thuringiensis* (B.t.) han estado comercialmente disponibles y se han usado como insecticidas medioambientalmente seguros y aceptables durante más de treinta años. El efecto insecticida de bacterias Bt se produce como resultado de proteínas que son exclusivamente producidas por estas bacterias que no persisten en el entorno, que son altamente selectivas en cuanto a las especies diana afectadas, ejercen sus efectos solo tras la ingestión por una plaga diana, y se ha mostrado que son inofensivas para plantas y otros organismos no diana, que incluyen seres humanos. Las plantas transgénicas que contienen uno o más genes que codifican proteína de B.t.

insecticida también están disponibles en la materia y son sorprendentemente eficaces en controlar la infestación de plagas de insectos. Un resultado sustancial del uso de plantas recombinantes que expresan proteínas insecticidas de Bt es una marcada disminución en la cantidad de agentes pesticidas químicos que se aplican al entorno para controlar la infestación de plagas en campos de cultivo en áreas en las que tales cultivos transgénicos se usan. La disminución en la aplicación de agentes pesticidas químicos ha producido tierras más limpias y aguas más limpias que corren de las tierras a las corrientes de alrededor, ríos, estanques y lagos. Además de estos beneficios medioambientales, ha habido un aumento perceptible en los números de insectos beneficiosos en los campos de cultivo en los que se cultivan cultivos transgénicos resistentes a insectos debido a la disminución en el uso de agentes insecticidas químicos.

Se ha informado de procedimientos y composiciones antisentido en la materia y se cree que ejercen sus efectos mediante la síntesis de una molécula de ARN monocatenario que en teoría se hibrida *in vivo* con una molécula de ARN de hebra codificante sustancialmente complementaria. La tecnología antisentido ha sido difícil de emplear en muchos sistemas por tres motivos principales, Primero, la secuencia antisentido expresada en la célula transformada es inestable. Segundo, la inestabilidad de la secuencia antisentido expresada en la célula transformada crea concomitantemente dificultad en la administración de la secuencia a un huésped, tipo de célula o sistema biológico remoto de la célula transgénica. Tercero, las dificultades encontradas con la inestabilidad y administración de la secuencia no codificante crea dificultades en intentar proporcionar una dosis dentro de la célula recombinante que expresa la secuencia antisentido que puede modular eficazmente el nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos codificante diana.

Ha habido algunas mejoras en las tecnologías para modular el nivel de expresión génica dentro de una célula, tejido u organismo, y en particular, una falta de tecnologías desarrolladas para retrasar, reprimir o reducir de otro modo la expresión de genes específicos usando tecnología de ADN recombinante. Además, como consecuencia de la imprevisibilidad de estos enfoques, no están disponibles medios comercialmente viables para modular el nivel de expresión de un gen específico en un organismo eucariota o procariota.

Previamente se ha demostrado la inhibición mediada por ARN bicatenario de genes específicos en diversas plagas. Se han probado enfoques mediados por ARNb para el control genético en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Tabara y col., 1998, Science 282:430-431). Tabara y col. describen un procedimiento para la administración de ARNb que participa en la generación de insectos transgénicos que expresan moléculas de ARN bicatenario o inyección de disoluciones de ARNb en el cuerpo del insecto o dentro del saco de huevos antes de o durante el desarrollo embrionario. Los investigadores de investigación han demostrado previamente que la supresión génica mediada por ARN bicatenario puede lograrse en nematodos tanto alimentando como humedeciendo los nematodos en disoluciones que contienen moléculas de ARN bicatenario o interferente pequeño y mediante inyección de las moléculas de ARNb. Rajagopal y col. describieron intentos fallidos de suprimir un gen endógeno en larvas de la plaga del insecto *Spodoptera litura* alimentando o humedeciendo larvas neonatas en disoluciones que contenían ARNb específico para el gen diana, pero fue satisfactorio en la supresión después de que las larvas se inyectaran con ARNb en la hemolinfa de larvas de 5º estadio usando un microaplicador (J. Biol. Chem., 2002, 277:46849-46851). Similarmente, Mesa y col. (documento US 2003/0150017) describieron proféticamente un sitio preferido para la inhibición de las larvas de lepidóptero *Helicoverpa armigera* usando ARNb administrado a las larvas por ingestión de una planta transformada para producir el ARNb. Se cree que sería poco práctico proporcionar moléculas de ARNb en la dieta de la mayoría de las especies de plagas de invertebrados o inyectar composiciones que contienen ARNb a los cuerpos de plagas de invertebrados. El procedimiento de la dieta de proporcionar moléculas de ARNb a plagas de invertebrados es poco práctico debido a que las moléculas de ARN, incluso moléculas de ARN bicatenario estabilizadas, son en efecto altamente inestables en entornos moderadamente alcalinos o ácidos tales como aquellos encontrados en los tubos digestivos de la mayoría de las plagas de invertebrados, y fácilmente degradadas por nucleasas en el entorno. Por tanto, existe una necesidad de procedimientos mejorados de modulación de la expresión génica reprimiendo, retrasando o reduciendo de otro modo la expresión génica dentro de una plaga de invertebrados particular con el fin de controlar la infestación de plagas o introducir novedosos rasgos fenotípicos.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a

(1) una composición que contiene dos o más agentes pesticidas diferentes, cada uno tóxico para la misma plaga del gusano de la raíz del maíz, en la que el primer agente pesticida es una molécula de ARNb que funciona suprimiendo una función biológica esencial en una o más células de la plaga del gusano de la raíz del maíz, y en la que el segundo agente pesticida es una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*;

(2) una realización preferida de (1) anterior, en la que dicha proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* está seleccionada de una Cry3, una TIC851, una CryET70, una Cry22, una VIP, una TIC901, una TIC1201, una TIC407, una TIC417, una proteína insecticida binaria seleccionada de CryET33 y CryET34, CryET80 y CryET76, TIC100 y TIC101 y PS149B1, y quimeras insecticidas de cualquiera de las proteínas insecticidas precedentes; y

(3) un procedimiento para controlar un gusano de la raíz del maíz, en particular, en plaga del gusano de la raíz

del maíz occidental (WCR, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) proporcionando en la dieta de la plaga de insectos dos o más agentes insecticidas tóxicos para la misma especie de insectos, en el que un primer agente insecticida comprende una molécula de ARNb expresada de una secuencia de ADN, en el que dicha molécula de ARNb inhibe una función biológica dentro de dicha plaga cuando es ingerida por dicha plaga, en el que una parte de dicha secuencia de ADN que consiste en al menos 21 nucleótidos contiguos presenta del 85% al 100% de identidad de secuencias de nucleótidos con una secuencia codificante seleccionada de SEC ID N°: 1-143, 169-174 y los complementos de las mismas, y en el que un segundo agente insecticida se proporciona junto con el primer agente insecticida en la dieta, en el que dicho segundo agente insecticida es como se define en la reivindicación 1 ó 2. La introducción de ARN bicatenario (ARNb) parcial o completamente estabilizado o sus formas modificadas tales como secuencias de ARN interferente pequeño (ARNip) en las células o en el entorno extracelular, tal como el intestino medio, dentro de un cuerpo de plaga del gusano de la raíz del maíz en el que el ARNb o ARNip entra en las células e inhibe la expresión de al menos uno o más genes diana y en el que la inhibición del uno o más genes diana ejerce un efecto perjudicial sobre la plaga del gusano de la raíz del maíz. Se contempla específicamente que el procedimiento y composición de la presente invención serán útiles en limitar o eliminar infestación de plaga del gusano de la raíz del maíz en o sobre el huésped de plaga, simbiote de plaga o entorno en el que una plaga prefiera, proporcionando una o más composiciones que comprenden moléculas de ARNb en la dieta de la plaga mientras que el pH del aparato digestivo de la plaga está dentro del intervalo de 4,5 a 9,5, de 5 a 9, de 6 a 8, y de pH 7,0.

La presente solicitud desvela un listado de secuencias a modo de ejemplo que contiene tanto las secuencias de nucleótidos como de aminoácidos del gusano de la raíz del maíz occidental (WCR, *Diabrotica virgifera*), como se expone en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 y SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174.

El listado de secuencias contiene la información del listado de secuencias para secuencias de Unigene del gusano de la raíz del maíz, secuencias de EST, secuencias de sondas específicas para el gusano de la raíz del maíz, secuencias de cebadores, secuencias de amplicones y secuencias que codifican secuencias de ARN bicatenario y ortólogos de V-ATPasa y de la proteína ribosómica L19 de otros insectos como se ha descrito anteriormente (SEC ID N°: 144 a SEC ID N°: 159).

En el presente documento se desvela un conjunto de secuencias de nucleótidos aisladas y purificadas como se expone en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 y SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias que se proporciona. Las secuencias de nucleótidos desveladas en el presente documento como se exponen en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 se aislaron y purificaron sustancialmente a partir de bibliotecas ADN de complementario (ADNc), preparadas a partir de larvas del insecto WCR. Las secuencias de nucleótidos desveladas en el presente documento como se exponen en SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 en el listado de secuencias se aislaron y purificaron sustancialmente a partir del ADN genómico de la plaga de insectos del gusano de la raíz del maíz del sur, o de conjuntos de ARNm aislados de la plaga de insectos, de secuencias de nucleótidos de ADNc derivadas de tales conjuntos de ARNm, o sintetizados *de novo* basándose en secuencias de nucleótidos desveladas en el presente documento o conocidas en la técnica como secuencias de promotores de ARN polimerasa del fago T7. También se desvela una molécula de ARNb o ARNip estabilizado o la expresión de uno o más ARNip para la inhibición de la expresión de un gen diana en una plaga de invertebrados tal como un insecto WCR. Una molécula de ARNb, miARN o ARNip estabilizado puede comprender al menos dos secuencias codificantes que están dispuestas en una orientación sentido y antisentido con respecto a al menos un promotor, en las que la secuencia de nucleótidos que comprende una hebra codificante y una hebra no codificante están ligadas o conectadas por una secuencia de espaciador de al menos de cinco a cien nucleótidos, en la que la hebra codificante y la hebra no codificante son de longitud diferente, y en la que cada una de las dos secuencias codificantes comparte al menos el 80% de identidad de secuencias, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, o incluso el 100% de identidad de secuencias, con una secuencia de nucleótidos como se expone en una de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en una de SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 en el listado de secuencias.

También se desvelan secuencias de nucleótidos que no se producen naturalmente (NNO) que pueden usarse para elegir como diana genes en la plaga de invertebrados para supresión mediada por ARN bicatenario con el fin de lograr la inhibición deseada de los genes diana. Una cualquiera de las secuencias de nucleótidos como se exponen en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 puede usarse para construir una secuencia de nucleótidos NNO tal.

También se desvela una construcción de ADN recombinante que codifica las moléculas de ARNb contempladas en el presente documento para introducción en una célula huésped. La construcción de ADN recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que se transcribe en ARN por la célula huésped. El ARN transcrito forma al menos una molécula de ARNb, de forma que una hebra de la molécula de ARNb está codificada por una parte de la secuencia de nucleótidos que es al menos del 80% al 100% idéntica a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en y SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 y SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174. La construcción de ADN recombinante puede producir moléculas de ARNb en la célula huésped e inhibir la expresión del gen endógeno o el gen diana o un derivado del mismo o una secuencia complementaria a la misma en la célula huésped, o en una célula de plaga tras la

digestión de la células huésped transformada por una plaga de invertebrados. Una secuencia de nucleótidos de la presente invención se coloca bajo el control de una secuencia de promotor que es operable en la célula huésped y se expresa para producir secuencias de ácidos ribonucleicos que forman moléculas de ARNb dentro de la célula huésped. Las moléculas de ARNb pueden procesarse adicionalmente tanto en la célula huésped como en una plaga de invertebrados para formar moléculas de ARNip.

También se desvela una secuencia de ADN recombinante para la transformación en planta construida para contener al menos una secuencia de nucleótidos que no se produce naturalmente que puede transcribirse en una molécula de ARN monocatenario. La molécula de ARN monocatenario forma una molécula de ARN bicatenario *in vivo* mediante hibridación intermolecular que, cuando se proporciona en la dieta de una plaga de invertebrados, inhibe la expresión de al menos un gen diana en una célula de la plaga de invertebrados. La secuencia de nucleótidos que no se produce naturalmente está operativamente ligada a al menos una secuencia de promotor que funciona en una célula de planta transgénica para transcribir la secuencia de nucleótidos que no se produce naturalmente operativamente ligada en una o más secuencias de ácidos ribonucleicos. Las secuencias de ARN se autoensamblan en moléculas de ARN bicatenario y se proporcionan en la dieta de una plaga de invertebrados que se alimenta de la planta transgénica. La provisión de las moléculas de ARNb en la dieta de la plaga consigue la inhibición deseada de la expresión de uno o más genes diana dentro de la plaga.

También se desvela una célula huésped recombinante que tiene en su genoma al menos una secuencia de ADN recombinante que se transcribe en la célula huésped para producir al menos una molécula de ARNb que funciona cuando es ingerida por una plaga de invertebrados para inhibir la expresión de un gen diana en la plaga. La molécula de ARNb está codificada por una parte de una secuencia de nucleótidos que presenta al menos del 80 al 100% de identidad con una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 en el listado de secuencias. Secuencias de nucleótidos a modo de ejemplo para su uso en construir agentes de ARNb que eligen como diana genes de WCR para la supresión son como se exponen en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 y SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 en el listado de secuencias.

También se desvela una construcción de ADN recombinante para la transformación en planta que consiste en al menos dos secuencias que no se producen naturalmente diferentes que, cuando se expresan *in vivo* como secuencias de ARN y se proporcionan en la dieta de una plaga de invertebrados, inhiben la expresión de al menos dos genes diana diferentes en la célula de la plaga de invertebrados. La primera secuencia que no se produce naturalmente se transcribe en ARN que forma al menos una primera molécula de ARNb. Una porción de la primera molécula de ARNb está codificada por una parte de la primera secuencia que no se produce naturalmente y presenta al menos del 80 al 100% de identidad con al menos una de las secuencias de nucleótidos como se exponen en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 en el listado de secuencias, y con la secuencia de nucleótidos del primer gen diana, derivado del mismo, o secuencia complementaria del mismo. La segunda secuencia que no se produce naturalmente se transcribe en ARN que forma una segunda molécula de ARNb. Una porción de la segunda molécula de ARNb está codificada por una parte de la segunda secuencia que no se produce naturalmente y presenta al menos del 80 al 100% de identidad con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo como se expone en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 y en SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 en el listado de secuencias y con la secuencia de nucleótidos del segundo gen diana, derivado del mismo, o secuencia complementaria del mismo. Las dos secuencias que no se producen naturalmente se colocan operablemente bajo el control de al menos una secuencia de promotor. La secuencia de promotor funciona expresando la primera y segunda moléculas de ARNb en la célula de planta transgénica. Las moléculas de ARNb se proporcionan en una concentración inhibidora de plaga en la dieta de una plaga de invertebrados que se alimenta con la planta transgénica, y la ingestión de células de planta por la plaga consigue la inhibición deseada de la expresión de los genes diana en la plaga.

También se desvelan células de planta transformadas que tienen en su genoma al menos una de las secuencias de ADN recombinante anteriormente mencionadas para la transformación en planta. Las plantas transgénicas se generan a partir de la célula de planta transformada, y las plantas de progenie, semillas y productos de planta, cada uno de los cuales comprende el ADN recombinante, se producen a partir de las plantas transgénicas.

El procedimiento y composición de la presente invención pueden aplicarse a cualquier planta monocotiledónea y dicotiledónea, dependiendo del control de plagas de invertebrados deseado, o puede aplicarse mediante formulaciones farmacéuticamente aceptables a los animales vertebrados con el fin de proporcionar algún nivel de reducción de infestación de plagas. Específicamente, las plantas pretenden comprender sin limitación alfalfa, eneldo, manzana, albaricoque, alcachofa, rúcula, espárrago, aguacate, banana, cebada, judías, remolacha, zarzamora, arándano, brócoli, coles de Bruselas, col, canola, melón cantalupo, zanahoria, mandioca, coliflor, apio, cereza, cilantro, cítrico, clementina, café, maíz, algodón, pepino, abeto de Douglas, berenjena, endivia, escarola, eucalipto, hinojo, higos, calabacino, uva, pomelo, rocío de miel, jícama, kiwi, lechuga, puerro, limón, lima, pino de Loblolly, mango, melón, seta, nuez, avena, oca, cebolla, naranja, una planta ornamental, papaya, perejil, guisante, melocotón, cacahuete, pera, pimienta, persimón, pino, piña, plátano, ciruela, granada, álamo, patata, calabaza, membrillo, Pinus radiata, achicoria roja, rábano, frambuesa, arroz, centeno, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, calabacín amarillo, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, batata, liquidámbar, tangerina, té, tabaco, tomate, césped, una vid, sandía, trigo, boniatos y plantas de calabacín

verde.

El agente de control de plagas de (1) anterior comprende una molécula de ARNb transcrita de una secuencia de nucleótidos de la presente invención. La secuencia de nucleótidos comparte al menos del 80 al 100% de identidad de secuencias con al menos una de las secuencias de nucleótidos como se exponen en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 en el listado de secuencias. En una forma, los agentes de control de plagas comprenden moléculas de ARNb. En otra forma, los agentes de control de plagas comprenden moléculas de ARNip. En otra forma adicional, los agentes de control de plagas comprenden secuencias de ADN recombinante que codifican moléculas de ARNm que forman las moléculas de ARNb o ARNip para la introducción en plantas y microbios. En otra forma más, los agentes de control de plagas son microbios que contienen secuencias de ADN recombinante que codifican las moléculas de ARN que forman las moléculas de ARNb o ARNip. El agente de control de plagas es un agente de control de plagas de gusanos de la raíz del maíz.

La invención también desvela una combinación de procedimientos y composiciones para controlar infestaciones de plagas de gusanos de la raíz del maíz. Un medio proporciona los procedimientos y composiciones de ARNb descritos en el presente documento para proteger plantas de la infestación de insectos junto con uno o más agentes insecticidas que presentan características diferentes de aquellas presentadas por los procedimientos y composiciones de ARNb. Por ejemplo, si se proporcionan proteínas de Bt en la dieta de plagas de insectos, se presenta un modo de acción para controlar la plaga de insectos que es espectacularmente diferente del modo de acción de los procedimientos y composiciones de la presente invención. Una composición, tanto formulada para administración tópica como una derivada usando un enfoque transgénico que combina procedimientos y composiciones de ARNb con procedimientos y composiciones de Bt, produce sinergias que no se conocían previamente en la materia para controlar la infestación de insectos. Las plantas transgénicas que producen una o más moléculas de ARNb o de ARNip que inhiben alguna función biológica esencial en una plaga diana junto con una o más proteína insecticidas de Bt que son tóxicas para la plaga diana proporcionan sinergias sorprendentes. Una sinergia es la reducción en el nivel de expresión requerido para tanto los ARNb(s) como la(s) proteína(s) de Bt. Cuando se combinan juntos se requiere una menor dosis eficaz de cada agente de control de plagas. Se cree que las proteínas insecticidas de Bt crean poros de entrada por los que las moléculas de ARNb o ARNip pueden penetrar más eficazmente en espacios remotos del intestino de la plaga de insectos, o más eficientemente en las células en la proximidad de lesiones creadas por las proteínas Bt, requiriendo así menos de tanto Bt como de ARNb para lograr el resultado insecticida deseado o la inhibición o supresión deseada de una función biológica elegida como diana en la plaga diana. Los inventores en el presente documento describen un procedimiento para controlar infestaciones de plagas del gusano de la raíz del maíz proporcionándose una dieta a la plaga un agente que comprende o que consiste en un ácido ribonucleico que funciona tras la digestión por la plaga para inhibir la expresión de una secuencia de nucleótidos diana que está dentro de las células de la plaga. El ácido ribonucleico que se proporciona en la dieta consiste en una secuencia de ribonucleótidos que es, o que es complementaria a, la secuencia de nucleótidos diana. La secuencia de ribonucleótidos se transcribe de una secuencia de ADN contigua que tiene al menos de 19 a 5000 nucleótidos de longitud y que está seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143, SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174, y el complemento de la misma. El procedimiento proporciona la construcción de una secuencia de nucleótidos que puede usarse para expresar una molécula de ARN que puede ser ingerida por la plaga en una dieta proporcionada a la plaga. La dieta puede ser una dieta artificial formulada para cumplir los requisitos nutricionales particulares para mantener una plaga con tal dieta, y complementarse con una cantidad de control de plagas del ARN que se ha purificado a partir de un sistema de expresión separado, siendo la complementación de la dieta con el fin de determinar la cantidad de control de plagas de la composición de ARN, o determinar si uno o más ARN particulares contruidos específicamente para unirse o hibridarse en parte con una o más secuencias diana dentro de la plaga son o no funcionales en alcanzar alguna actividad represora de genes tras la digestión de la dieta complementada por la plaga. La dieta también puede ser una célula recombinante transformada con una secuencia de ADN construida para la expresión del agente, el ARN o el agente de supresión génica. Tras la digestión de una o más de tales células transformadas por la plaga se observa un resultado genotípico o fenotípico deseado, que indica que el agente ha funcionado inhibiendo la expresión de una secuencia de nucleótidos diana que está dentro de las células de la plaga.

Una secuencia de ADN que se selecciona para su uso en la expresión de un agente de supresión génica de la presente invención tiene preferentemente al menos 19 a 5000 nucleótidos de longitud, y es al menos en parte sustancialmente idéntico en secuencia a la hebra codificante o no codificante de una secuencia diana presente en el ADN de una o más especies de plaga diana particular. El término "al menos en parte" pretende referirse al concepto de que la secuencia de ADN seccionada para su uso en la expresión de un agente de supresión génica puede construirse a partir de una única secuencia derivada de una o más plagas diana y prevista para su uso en la expresión de un ARN que funciona en la supresión de un único gen o familia de genes en la una o más plagas diana, o que la secuencia de ADN puede construirse como una quimera a partir de una pluralidad de secuencias de ADN. La pluralidad de secuencias de ADN puede cada una derivarse de una o más secuencias de nucleótidos de dentro de una única plaga, o puede derivarse de una o más secuencias de nucleótidos de una pluralidad de plagas diferentes. En particular, la secuencia seleccionada debe presentar del 80 al 100% de identidad de secuencias de nucleótidos con una secuencia de nucleótidos a partir del ADN de la especie de plaga. El ADN de la especie de plagas puede identificarse aislando directamente el ADN de la especie de

plaga o por identificación de secuencias de ARN dentro de la especie de plaga y traduciendo inversamente las secuencias de ARN a ADN. Secuencias que ejemplifican ADN de especies de plagas del gusano de la raíz del maíz se exponen en el presente documento en el listado de secuencias como SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143, SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174, y los complementos de las mismas.

5 Las secuencias de ADN seleccionadas para su uso en la expresión de una molécula de ARN supresora de genes pueden incluirse en una composición de polinucleótido para su uso en una célula de planta. En particular, las secuencias de ADN pueden incorporarse en un vector para su uso en transformar el genoma de una célula de planta, y pueden incorporarse en un casete de expresión que contiene al menos un promotor funcional de planta operativamente ligado a la secuencia de ADN seleccionada junto con cualquier otro elemento de control de la expresión deseado para lograr un nivel de expresión temporal celular o espacial en plantas apropiado. La introducción de la composición de polinucleótido en el genoma de una célula de planta proporciona una célula transformada que puede seleccionarse, siempre que medios selectivos apropiados se hayan incluido junto con la composición de polinucleótido, y regenerarse en un planta recombinante transgénica. La planta transgénica, un evento, puede proporcionarse en la dieta de la plaga o plagas para lograr el control de una infestación de plagas. La planta transgénica puede dar lugar a plantas de progeñie, células de planta y semillas que contienen cada una la composición de polinucleótido.

Se desvela un procedimiento para proteger una planta de infestación de insectos proporcionando a la plaga de insectos una o más de las células de planta que expresan cada una una molécula de ARN supresora de genes de una secuencia de ADN que está seleccionada del grupo que consiste en las secuencias ejemplificadas en el presente documento. La ingestión de las células de planta que contienen el ARN supresor de genes, el agente de control de plagas o insectos, produce la inhibición de una o más funciones biológicas en la plaga o insecto.

La composición de (1) anterior contiene dos o más agentes pesticidas diferentes cada uno tóxico para la misma plaga o especie de insectos. Como se indica en el presente documento, uno de estos agentes pesticidas es una molécula de ARN que funciona suprimiendo una función biológica esencial en una o más células de la plaga. El segundo agente pesticida se incluye junto con el primero. El segundo agente es una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*. La proteína insecticida de *Bacillus sphaericus* y una lignina. Una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* puede ser distintas proteínas insecticidas que incluyen, pero no se limitan a, una Cry1, una Cry3, una TIC851, una CryET70, una Cry22, una proteína insecticida binaria CryET33 y CryET34, una proteína insecticida binaria CryET80 y CryET76, una proteína insecticida binaria TIC100 y TIC101, una proteína insecticida binaria PS149B1, una proteína insecticida VIP, una TIC900 o proteína relacionada, una TIC901, TIC1201, TIC407, TIC417, y quimeras insecticidas de cualquiera de las proteínas insecticidas precedentes.

El gen elegido como diana para la supresión, o la función en una célula de plaga o como un aspecto fisiológico o metabólico de la plaga que se activa por la expresión del gen elegido como diana para la supresión, puede codificar una proteína esencial, cuya función predicha está seleccionada del grupo que consiste en formación de músculo, formación de hormona juvenil, regulación de la hormona juvenil, regulación y transporte de iones, síntesis de enzimas digestivas, mantenimiento del potencial de la membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación de esperma, síntesis de feromonas, sensibilización de feromonas, formación de antenas, formación de alas, formación de patas, desarrollo y diferenciación, formación de huevos, maduración de larvas, formación de enzimas digestivas, síntesis de hemolinfa, mantenimiento de hemolinfa, neurotransmisión, división celular, metabolismo energético, respiración y apoptosis. Se prefiere que la secuencia de ADN seleccionada para construir la construcción de supresión se derive de las secuencias de nucleótidos expuestas en el listado de secuencias para la supresión de un gen del gusano de la raíz del maíz. Se imagina que el procedimiento para controlar la infestación de plagas de invertebrados incluirá proporcionar en la dieta de la plaga de invertebrados un agente, por ejemplo, una primera secuencia de ribonucleótidos expresada de una primera secuencia de ADN que funciona tras la digestión por la plaga para inhibir una función biológica dentro de dicha plaga, y que la primera secuencia de ADN presente del 85 al 100% de identidad de secuencias de nucleótidos con una secuencia codificante derivada de dicha plaga. La primera secuencia de ribonucleótidos puede hibridarse con una segunda secuencia de ribonucleótidos que es complementaria o sustancialmente complementaria a la primera secuencia de ribonucleótidos, y la segunda secuencia de ribonucleótidos se expresa a partir de una segunda secuencia de ADN que se corresponde con una secuencia codificante derivada de la plaga de invertebrados, seleccionada de las secuencias expuestas en el presente documento en el listado de secuencias, o los complementos de las mismas. Se prefiere que la primera y la segunda secuencia de ADN comprendan una secuencia contigua de identidad con una o más de las secuencias expuestas en el listado de secuencias, y tenga de 14 a 25 o más nucleótidos contiguos.

La invención funciona al óptimo cuando una dieta que contiene una cantidad supresora de genes de plaga de un agente insecticida, tal como una o más de las moléculas de ARN producidas a partir de la expresión de una o más secuencias expuestas en el presente documento en el listado de secuencias, se proporciona a una plaga de invertebrados que presenta un pH del aparato digestivo que es de 4,5 a 9,5, o de 5,0 a 9,0, o de 5,5 a 8,5, o de 6,0 a 8,0, o de 6,5 a 7,0, o 7,0. Cualquiera de los procedimientos, ácidos nucleicos, ácidos ribonucleicos, secuencias de ribonucleótidos, composiciones, plantas, células de planta, plantas de progeñie, semillas, agentes de control de insectos, agentes de control de plagas, casetes de expresión, descritos en el presente documento son opcionalmente funcionales cuando se

proporcionan en una dieta a una o más plagas que comprenden un pH del tubo digestivo tal.

La dieta de la presente invención puede ser cualquier dieta suficiente de plagas que incluye, pero no se limitan a, una dieta o formulación artificial, una célula de planta, una pluralidad de células de planta, un tejido de planta, una raíz de planta, una semilla de planta y una planta cultivada a partir de una semilla de planta, en la que la dieta comprende una cantidad inhibidora de plagas de una molécula de ARN codificada a partir de una secuencia de ADN que es o es complementaria a, o es sustancialmente o es sustancialmente complementaria a uno o más contiguos al menos de 19 a 5000 nucleótidos seleccionados de las secuencias de nucleótidos expuestas en el listado de secuencias, o seleccionados de secuencias de nucleótidos derivadas de una especie de plaga de invertebrados particular.

Productos y/o composiciones agronómica y comercialmente importantes de materia que incluyen, pero no se limitan a, pienso animal, materias primas, y productos y subproductos del maíz que están previstos para su uso como alimento para consumo humano o para su uso en composiciones y materias primas que están previstas para consumo humano que incluyen, pero no se limitan a, maicena, harina de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, palomitas, pasteles de maíz, cereales que contienen maíz y subproductos de maíz, pretenden estar dentro del ámbito de la presente invención si estos productos y composiciones de materia contienen cantidades detectables de las secuencias de nucleótidos expuestas en el presente documento que son diagnósticas de cualquier evento transgénico que contenga tales secuencias de nucleótidos. Estos productos son útiles al menos debido a que es probable que se deriven de cultivos y productos agrícolas que se propagan en campos que contienen menos pesticidas y organofosfatos como resultado de su incorporación de los nucleótidos de la presente invención para controlar la infestación de plagas de invertebrados en plantas. Tales materias primas y productos de materias primas se producen a partir de semilla producida de una planta transgénica, en la que la planta transgénica expresa ARN de uno o más nucleótidos contiguos de la presente invención o nucleótidos de una o más plagas de invertebrados y los complementos de las mismas. Tales materias primas y productos de materias primas también pueden ser útiles en controlar plagas de invertebrados de tales materias primas y productos de materias primas tales como, por ejemplo, control de gorgojos de la harina, debido a la presencia en la materia prima o producto de materia prima del ARN supresor del gen de la plaga expresado de una secuencia de gen como se expone en la presente invención.

### Descripción detallada de la invención

Lo siguiente es una descripción detallada de la invención proporcionada para ayudar a aquellos expertos en la materia en la práctica de la presente invención. Aquellos expertos habituales en la materia pueden hacer modificaciones y variaciones en las realizaciones descritas en el presente documento sin apartarse del espíritu o ámbito de la presente invención.

Los inventores han descubierto en el presente documento que, a diferencia de las enseñanzas en la técnica anterior, alimentar una composición que contiene moléculas de ARN bicatenario que consisten en secuencias encontradas dentro de una o más secuencias de nucleótidos expresadas de una especie de invertebrado a la especie de invertebrado de la que se obtuvieron las secuencias de nucleótidos produce la inhibición de una o más funciones biológicas dentro de la especie de invertebrado. Particularmente, los inventores han descubierto que alimentar moléculas de ARN bicatenario que consisten en secuencias de ARN del gusano de la raíz del maíz respectivamente a gusanos de la raíz del maíz produce la muerte o inhibición del desarrollo y diferenciación de los gusanos de la raíz del maíz que ingieren estas composiciones.

Los inventores han identificado la secuencia de nucleótidos de miles de secuencias de ADNc obtenidas de cada una de las especies de plagas de invertebrados. Las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADNc se dedujeron y se compararon con todas las secuencias de aminoácidos conocidas. Se predice que muchas de las secuencias de ADNc codifican proteínas que tienen alguna información de anotación asociada a ellas. La información de anotación que está asociada a una secuencia de nucleótidos particular y secuencia de proteínas codificada a partir de la misma se basa en la homología o similitud entre las secuencias de aminoácidos deducidas mediante traducción de las secuencias de ADNc descritas en el presente documento como se expone en y secuencias de aminoácidos que se conocen en la técnica en bases de datos públicamente disponibles. Las secuencias de aminoácidos deducidas como se exponen en el presente documento fueron BLASTX-ed contra todas las secuencias de aminoácidos conocidas, y funcionalidades probables de cada una de las secuencias de aminoácidos deducidas se asignaron basándose en los resultados de alineamiento. Las secuencias de ADNc que codifican proteínas o partes de proteínas conocidas en la técnica por ser esenciales para la supervivencia, tales como secuencias de aminoácidos que participan en diversas rutas bioquímicas metabólicas o catabólicas, división celular, reproducción, metabolismo energético, digestión y función neurológica, se seleccionaron para su uso en preparar moléculas de ARN bicatenario que se proporcionaron en la dieta de una plaga de invertebrados. Como se describe en el presente documento, la ingestión por una plaga diana de composiciones que contienen uno o más ARNb, al menos un segmento del cual se corresponde con al menos un segmento de ARN sustancialmente idéntico producido en las células de la plaga diana, produjo muerte, atrofia u otra inhibición de la plaga diana. Estos resultados indicaron que una secuencia de nucleótidos, tanto ADN como ARN, derivada de una plaga de invertebrados puede usarse para construir una plaga huésped recombinante o simbiote que es una diana para la infestación por la plaga. La plaga huésped o simbiote puede transformarse para contener una o más de las secuencias de nucleótidos derivadas de la plaga de invertebrados. La secuencia de nucleótidos transformada en la

plaga huésped o simbiote codifica uno o más ARN que forman una secuencia de ARNb en las células o fluidos biológicos dentro del huésped o simbiote transformado, proporcionando así el ARNb en la dieta de la plaga si/cuando la plaga se alimenta del huésped o simbiote transgénico, produciendo la supresión de la expresión de uno o más genes en las células de la plaga y por último lugar la muerte, atrofia u otra inhibición de la plaga.

5 La presente invención se refiere generalmente al control genético de infestaciones de plagas de invertebrados en organismos huésped. Más particularmente, la presente invención incluye los procedimientos para la administración de agentes de control de plagas a una plaga de invertebrados. Tales agentes de control de plagas producen, directamente o indirectamente, una alteración en la capacidad de la plaga para mantenerse a sí misma, crecer o de otro modo infestar un huésped o simbiote diana. La presente invención proporciona procedimientos para emplear moléculas de ARNb estabilizado en la dieta de la plaga como un medio para la supresión génica elegida como diana en la plaga, consiguiéndose así el control deseado de infestaciones de plagas en o sobre el huésped o simbiote elegido como diana por la plaga. Pueden producirse plantas transgénicas usando los procedimientos de la presente invención que expresan moléculas de ARNb o de ARNip estabilizado recombinante.

10 En la realización de lo anterior, la presente invención proporciona un procedimiento para inhibir la expresión de un gen diana en una plaga de invertebrados, y en particular, en gusano de la raíz del maíz occidental (WCR) u otra especie de insectos coleópteros, produciendo el cese de la alimentación, crecimiento, desarrollo, reproducción, infectividad y eventualmente puede producir la muerte de la plaga. El procedimiento comprende introducir parcial o completamente moléculas de nucleótidos de ARN bicatenario (ARNb) estabilizado o sus formas modificadas tales como moléculas de ARN interferente pequeño (ARNip) en una composición nutricional en la que la plaga se basa como fuente de alimentos, y proporcionar la composición nutricional para que la plaga se alimente. La ingestión de la composición nutricional que contiene las moléculas bicatenarias o de ARNip produce la captación de las moléculas por las células de la plaga, produciendo la inhibición de la expresión de al menos un gen diana en las células de la plaga. La inhibición del gen diana ejerce un efecto perjudicial sobre la plaga. Las moléculas de ARNb o moléculas de ARNip consisten en secuencias de nucleótidos como se exponen en cualquiera de, SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 y SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174, cuya inhibición produce la reducción o eliminación de un agente de secuencias de proteínas o de nucleótidos que es esencial para el crecimiento y desarrollo de la plaga u otra función biológica. La secuencia de nucleótidos seleccionada presenta del 80% a al menos el 100% de la identidad de secuencias con una de las secuencias de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 y SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se expone en el listado de secuencias, o el complemento de la misma. Tal inhibición es específica porque se elige una secuencia de nucleótidos de una parte del gen diana de la que se transcribe el ARNb o ARNip inhibidor. El procedimiento es eficaz en inhibir la expresión de al menos un gen diana y puede usarse para inhibir muchos tipos de genes diana diferentes en la plaga.

15 La presente invención también proporciona diferentes formas de los agentes de control de plagas para lograr la reducción deseada en la infestación de plagas. En una forma, los agentes de control de plagas comprenden moléculas de ARNb. En otra forma, los agentes de control de plagas comprenden moléculas de ARNip. En otra forma adicional, los agentes de control de plagas comprenden construcciones de ADN recombinante que pueden usarse para transformar establemente microorganismos o plantas, permitiendo que los microbios o plantas transformados codifiquen las moléculas de ARNb o ARNip. En otra forma, los agentes de control de plagas son microbios que contienen las construcciones de ADN recombinante que codifican las moléculas de ARNb o ARNip.

20 Pares de secuencias de nucleótidos aisladas y purificadas se proporcionan de información de bibliotecas de ADNc y/o de bibliotecas genómicas. Los pares de secuencias de nucleótidos se derivan de cualquier plaga de invertebrados preferida para su uso como cebadores de amplificación térmica para generar las moléculas de ARNb y de ARNip de la presente invención.

25 La presente invención proporciona construcciones de ADN recombinante para su uso en conseguir transformación estable de dianas huésped o de plagas simbiotes particulares. Las dianas huésped o de plagas simbiotes transformadas expresan niveles pesticidamente eficaces de moléculas de ARNb o de ARNip preferidas a partir de las construcciones de ADN recombinante, y proporcionan las moléculas en la dieta de la plaga.

30 La presente invención también proporciona, como un ejemplo de un organismo huésped o diana de plaga simbiote transformado, células de planta transformadas y plantas transformadas y su progenie. Las células de planta transformadas y las plantas transformadas expresan una o más de las secuencias de ARNb o de ARNip de la presente invención a partir de una o más de las secuencias de ADN como se exponen en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 y SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias, o el complemento de las mismas.

35 Como se usa en el presente documento, las palabras "supresión génica", cuando se toman conjuntamente, pretenden referirse a cualquiera de los procedimientos muy conocidos para reducir los niveles de proteína producidos como resultado de transcripción génica a ARNm y posterior traducción del ARNm. La supresión génica también pretende significar la reducción de la expresión de proteínas de un gen o una secuencia codificante que incluye supresión génica postranscripcional y supresión transcripcional. La supresión génica postranscripcional está mediada por la homología

entre todo o una parte de un ARNm transcrito de un gen o secuencia codificante elegida como diana para la supresión y el ARN bicatenario correspondiente usado para supresión, y se refiere a la reducción sustancial y medible de la cantidad de ARNm disponible en la célula para unión por ribosomas. El ARN transcrito puede estar en la orientación sentido para efectuar lo que se llama la co-supresión, en la orientación antisentido para efectuar lo que se llama la supresión antisentido, o en ambas orientaciones haciendo que un ARNb efectúa lo que se llama interferencia de ARN (ARNi). La supresión transcripcional está mediada por la presencia en la célula de un ARNb, un agente de supresión génica, que presenta identidad sustancial de secuencias con una secuencia de ADN de promotor o el complemento del mismo para efectuar lo que se denomina supresión de promotores *trans*. La supresión génica puede ser eficaz contra un gen de planta nativo asociado a un rasgo, por ejemplo, para proporcionar plantas con niveles reducidos de una proteína codificada por el gen nativo o con niveles potenciados o reducidos de un metabolito afectado. La supresión génica también puede ser eficaz contra genes diana en plagas de planta que pueden ingerir o ponerse en contacto con material de planta que contiene agentes de supresión génica, específicamente diseñados para inhibir o suprimir la expresión de una o más secuencias homólogas o complementarias en las células de la plaga.

La supresión génica postranscripcional por ARN orientado antisentido o sentido para regular la expresión génica en células de planta se desvela en las patentes de EE.UU. n° 5.107.065, 5.759.829, 5.283.184 y 5.231.020. El uso de ARNb para suprimir genes en plantas se desvela en los documentos WO 99/53050, WO 99/49029, las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 2003/0175965 y 2003/0061626, solicitud de patente de EE.UU. n° 10/465.800, y las patentes de EE.UU. n° 6.506.559 y 6.326.193.

Un procedimiento preferido de supresión génica postranscripcional en plantas emplea ARN transcrito tanto orientado en sentido como orientado en antisentido que está estabilizado, por ejemplo, como una estructura de horquilla y tallo y lazo. Una construcción de ADN preferida para efectuar la supresión génica postranscripcional es una en la que un primer segmento codifica un ARN que presenta una orientación antisentido que presenta identidad sustancial con un segmento de un gen elegido como diana para la supresión, que está ligado a un segundo segmento que codifica un ARN que presenta complementariedad sustancial con el primer segmento. Se esperaría que una construcción tal formara una estructura de tallo y lazo por hibridación del primer segmento con el segundo segmento y una estructura de lazo a partir de las secuencias de nucleótidos que enlazan los dos segmentos (véanse los documentos WO94/01550, WO98/05770, US 2002/0048814 y US 2003/0018993).

Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" se refiere a un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótido o ribonucleótido leídas desde el extremo 5' al 3'. El "ácido nucleico" puede también contener opcionalmente bases de nucleótidos que no se producen naturalmente o alteradas que permiten la correcta ultralectura por una polimerasa y no reducen la expresión de un polipéptido codificado por ese ácido nucleico. El término "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a tanto las hebras codificantes como no codificantes de un ácido nucleico como o bien hebras únicas individuales o bien en dúplex. El término "ácido ribonucleico" (ARN) incluye ARNi (ARN inhibidor), ARNb (ARN bicatenario), ARNip (ARN interferente pequeño), ARNm (ARN mensajero), miARN (micro-ARN), ARNt (ARN de transferencia, tanto si está cargado como descargado con un aminoácido acilado correspondiente) y ARNc (ARN complementario) y el término "ácido desoxirribonucleico" (ADN) incluye ADNc y ADN genómico e híbridos de ADN-ARN. Las palabras "segmento de ácido nucleico", "segmento de secuencia de nucleótidos", o más generalmente "segmento" se entenderá por aquellos en la materia como un término funcional que incluye tanto secuencias genómicas, secuencias de ARN ribosómico, secuencias de ARN de transferencia, secuencias de ARN mensajero, secuencias de operones y secuencias de nucleótidos manipuladas más pequeñas que expresan o pueden adaptarse para expresar proteínas, polipéptidos o péptidos.

Como se usa en el presente documento, el término "plaga" se refiere a insectos, arácnidos, crustáceos, hongos, bacterias, virus, nematodos, platelmintos, ascárides, oxiuros, anquilostomas, tenias, tripanosomas, esquistosomas, éstridos, pulgas, garrapatas, ácaros y piojos que son ubicuos en el entorno humano y que pueden ingerirse o ponerse en contacto con una o más células, tejidos o fluidos producidos por una plaga huésped o simbiote transformado para expresar o recubierto con un agente de supresión génica bicatenario o que pueden ingerir material de planta que contiene el agente de supresión génica. Como se usa en el presente documento, un rasgo de "resistencia a plagas" es una característica de una planta transgénica, animal transgénico, huésped transgénico o simbiote transgénico que hace que la planta, animal, huésped o simbiote sea resistente al ataque de una plaga que normalmente puede ocasionar daño o pérdida a la planta, animal, huésped o simbiote. Tal resistencia a plagas puede producirse a partir de una mutación natural o más normalmente a partir de incorporación de ADN recombinante que confiere resistencia a plagas. Para conferir resistencia a insectos a una planta transgénica, un ADN recombinante puede codificar, por ejemplo, una proteína letal para insectos o inhibidora de insectos tal como una endotoxina delta derivada de una bacteria *B. thuringiensis*, por ejemplo, como se usa en variedades comercialmente disponibles de algodón y maíz, o transcribirse en un molécula de ARN que forma una molécula de ARNb dentro de los tejidos o fluidos de la planta recombinante. La molécula de ARNb comprende en parte de un segmento de ARN que es idéntico a un segmento de ARN correspondiente codificado a partir de una secuencia de ADN dentro de una plaga de insectos que prefiere alimentarse de la planta recombinante. La expresión del gen dentro de la plaga de insectos diana se suprime por el ARNb, y la supresión de la expresión del gen en la plaga de insectos diana

hace que la planta sea resistente a insectos. Fire y col. (patente de EE.UU. nº 6.506.599) describieron genéricamente la inhibición de infestación de plagas, proporcionando detalles solo sobre varias secuencias de nucleótidos que eran eficaces para la inhibición de la función génica en la especie de nematodos *Caenorhabditis elegans*. Similarmente, Plaetinck y col. (documento US 2003/0061626) describen el uso de ARNb para inhibir la función génica en una variedad de plagas de nematodos. Mesa y col. (documento US 2003/0150017) describen usar secuencias de ADNb para transformar células huésped para expresar secuencias de ARNb correspondientes que son sustancialmente idénticas a secuencias diana en patógenos específicos, y particularmente describen la construcción de plantas recombinantes que expresan tales secuencias de ARNb para ingestión por diversas plagas de plantas, facilitando la regulación por disminución de un gen en el genoma de la plaga y mejorando la resistencia de la planta a la infestación de plagas.

La presente invención proporciona inhibir la expresión génica de uno o múltiples genes diana en un insecto diana usando procedimientos de ARNb estabilizado. La invención es particularmente útil en la modulación de la expresión génica de eucariotas, en particular la modulación de la expresión de genes presentes en insectos que presentan un nivel de pH del aparato digestivo que es de 4,5 a 9,5, más preferentemente de 5,0 a 8,0, e incluso más preferentemente de 6,5 a 7,5. Las plagas de plantas con un aparato digestivo que presenta niveles de pH fuera de estos intervalos no son candidatos preferidos para procedimientos mediados por ARN bicatenario para la supresión génica usando un procedimiento de administración que requiere la ingestión de las moléculas de ARNb preferidas. El efecto modulador es aplicable a una variedad de genes expresados en las plagas que incluyen, por ejemplo, genes endógenos responsables del metabolismo celular o transformación celular, que incluyen genes de mantenimiento, factores de transcripción y otros genes que codifican polipéptidos que participan en el metabolismo celular.

Como se usa en el presente documento, el término “expresión” se refiere a la transcripción y acumulación estable de ARN sentido o antisentido derivado de los ácidos nucleicos desvelados en la presente invención. La expresión puede también referirse a traducción de ARNm en un polipéptido o proteína. Como se usa en el presente documento, el término ARN “sentido” se refiere a un ARN transcrito correspondiente a una secuencia o segmento que, cuando se produce por la plaga diana, está en forma de un ARNm que puede traducirse en proteína por la célula de plaga diana. Como se usa en el presente documento, el término “ARN antisentido” se refiere a un ARN transcrito que es complementario a todo o una parte de un ARNm que normalmente se produce en una célula de una plaga diana. La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte del transcrito génico específico, es decir, en la secuencia no codificante de 5', secuencia no traducida de 3', intrones, o la secuencia codificante. Como se usa en el presente documento, el término “transcrito de ARN” se refiere al producto resultante de la transcripción catalizada por ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Si el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN se denomina el transcrito primario, o puede ser una secuencia de ARN derivada de procesamiento postranscripcional del transcrito primario y se denomina el ARN maduro.

Como se usa en el presente documento, la expresión “inhibición de la expresión génica” o “inhibir la expresión de un gen diana en la célula de un insecto” se refiere a la ausencia (o disminución observable) en el nivel de proteína y/o producto de ARNm del gen diana. La especificidad se refiere a la capacidad para inhibir el gen diana sin manifestar efectos sobre otros genes de la célula y sin ningún efecto sobre ningún gen dentro de la célula que está produciendo la molécula de ARNb. La inhibición de la expresión génica del gen diana en la plaga de insectos puede producir rasgos fenotípicos novedosos en la plaga de insectos.

Sin limitar el ámbito de la presente invención, en un aspecto se proporciona un procedimiento para controlar la infestación de un insecto diana usando las estrategias de ARNb estabilizado. El procedimiento implica generar moléculas de ARNb estabilizado como un tipo de agentes de control de insectos para inducir silenciamiento de genes en una plaga de insectos. Los agentes de control de insectos de la presente invención inducen directamente o indirectamente acontecimientos de silenciamiento de genes postranscripcionales de genes diana en el insecto. La regulación por disminución de la expresión del gen diana previene o al menos retarda el crecimiento del insecto, desarrollo, reproducción e infectividad a huéspedes. Como se usa en el presente documento, el término “generar molécula de ARNb estabilizado” se refiere a los procedimientos de emplear tecnologías de ADN recombinante fácilmente disponibles en la materia (por ejemplo, por Sambrook y col., en: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) para construir una secuencia de nucleótidos de ADN que transcribe el ARNb estabilizado. Los procedimientos de construcción detallados de la presente invención se desvelan más adelante en la presente divulgación. Como se usa en el presente documento, el término “silenciar” se refiere a la “regulación por disminución” eficaz de la expresión de la secuencia de nucleótidos elegida como diana y, por tanto, a la eliminación de la capacidad de la secuencia para producir un efecto dentro de la célula del insecto.

La presente invención proporciona en parte un sistema de administración para la administración de los agentes de control de insectos a insectos mediante su exposición a una dieta que contiene los agentes de control de insectos de la presente invención. Según una de las realizaciones, las moléculas de ARNb o de ARNip estabilizado pueden incorporarse en la dieta del insecto o puede recubrirse sobre la parte superior de la dieta para consumo por un insecto.

La presente invención también proporciona en parte un sistema de administración para la administración de los agentes

de control de insectos a insectos mediante su exposición a un microorganismo o un huésped tal como una planta que contiene los agentes de control de insectos de la presente invención por ingestión del microorganismo o las células huésped o el contenido de las células. Según otra de las realizaciones, la presente invención implica generar una célula de planta transgénica o una planta que contiene una construcción de ADN recombinante que transcribe las moléculas de ARNb estabilizado de la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término “generar una célula de planta o una planta transgénica” se refiere a los procedimientos de emplear las tecnologías de ADN recombinante fácilmente disponibles en la materia (por ejemplo, por Sambrook y col.) para construir una transformación en vector de planta que transcribe las moléculas de ARNb estabilizado de la presente invención, para transformar la célula de planta o la planta y para generar la célula de planta transgénica o la planta transgénica que contiene las moléculas de ARNb estabilizado transcrito. En particular, el procedimiento de la presente invención puede comprender la construcción recombinante en una célula de una planta que produce transcritos de ARNb que son sustancialmente homólogos a una secuencia de ARN codificada por una secuencia de nucleótidos dentro del genoma de un insecto. Si la secuencia de nucleótidos dentro del genoma de un insecto codifica un gen esencial para la viabilidad e infectividad del insecto, su regulación por disminución produce una capacidad reducida del insecto para sobrevivir e infectar células huésped. Por tanto, tal regulación por disminución produce un “efecto perjudicial” sobre la viabilidad del mantenimiento e infectividad del insecto, porque previene o reduce la capacidad del insecto para alimentarse y sobrevivir sobre nutrientes derivados de las células huésped. En virtud de esta reducción en la viabilidad e infectividad del insecto, la resistencia y/o tolerancia potenciada para infección por un insecto se facilita en las células de una planta. Los genes en el insecto pueden elegirse como diana en los estadios maduro (adulto), inmaduro (larva) o de huevo.

En otra realización más, cepas atenuadas no patógenas de microorganismos pueden usarse como vehículo para los agentes de control de insectos y, en esta perspectiva, los microorganismos que llevan tales agentes también se denominan agentes de control de insectos. Los microorganismos pueden manipularse para expresar una secuencia de nucleótidos de un gen diana para producir las moléculas de ARN que comprenden secuencias de ARN homólogo o complementario a secuencias de ARN normalmente encontrado dentro de las células de un insecto. La exposición de los insectos a los microorganismos produce ingestión de los microorganismos y regulación por disminución de la expresión de genes diana mediada directamente o indirectamente por las moléculas de ARN o fragmentos o derivados de las mismas.

La presente invención proporciona alternativamente la exposición de un insecto a los agentes de control de insectos de la presente invención incorporados en una mezcladora por pulverización y aplicados a la superficie de un huésped, tal como una planta huésped. En una realización a modo de ejemplo, la ingestión de los agentes de control de insectos por un insecto administra los agentes de control de insectos al intestino del insecto y posteriormente a las células dentro del cuerpo del insecto. En otra realización, la infección del insecto por los agentes de control de insectos mediante otros medios tales como mediante inyección u otros procedimientos físicos también permite la administración de los agentes de control de insectos. En otra realización más, las propias moléculas de ARN están encapsuladas en una matriz sintética tal como un polímero y se aplican a la superficie de un huésped tal como una planta. La ingestión de las células huésped por un insecto permite la administración de los agentes de control de insectos al insecto y produce la regulación por disminución de un gen diana en el huésped. Se imagina que las composiciones de la presente invención pueden incorporarse dentro de las semillas de una especie de planta tanto como un producto de expresión de un gen recombinante incorporado en un genoma de las células de planta, como incorporado en un recubrimiento o tratamiento de semilla que se aplica a la semilla antes de sembrarla. La célula de planta que contiene un gen recombinante se considera en el presente documento que es un evento transgénico.

Se cree que un tratamiento de semillas pesticida puede proporcionar ventajas significativas cuando se combina con un evento transgénico que proporciona protección de infestación de plagas de invertebrados que está dentro del intervalo de eficacia preferido contra una plaga diana. Además, se cree que hay situaciones que son muy conocidas para aquellos expertos en la materia, en las que es ventajoso tener tales eventos transgénicos dentro del intervalo de eficacia preferido.

La presente invención también incluye semillas y plantas que tienen más de un evento transgénico. Tales combinaciones se denominan eventos transgénicos “apilados”. Estos eventos transgénicos apilados pueden ser eventos que están dirigidos a la misma plaga diana, o pueden estar dirigidos a diferentes plagas diana. En un procedimiento preferido, una semilla que tiene la capacidad para expresar una proteína Cry 3 o variante insecticida de la misma también tiene la capacidad para expresar al menos otro agente insecticida que incluye, pero no se limita a, una proteína que es diferente de una proteína Cry 3 y/o una molécula cuya secuencia de ARN se deriva de la secuencia de un ARN expresado en una plaga diana y que forma una estructura de ARN bicatenario con la expresión en la semilla o células de una planta cultivada a partir de la semilla, en el que la ingestión de una o más células de la planta por la plaga diana produce la supresión de la expresión del ARN en las células de la plaga diana.

En otro procedimiento preferido, la semilla que tiene la capacidad para expresar una secuencia de ARNb que se deriva de una plaga diana también tiene un evento transgénico que proporciona tolerancia a herbicidas. Se prefiere que el evento transgénico que proporciona tolerancia a herbicidas sea un evento que proporciona resistencia a glifosato, N-(fosfometil) glicina, que incluye la forma de sal de isopropilamina de tal herbicida.

En el presente procedimiento, una semilla que comprende un evento transgénico se trata con un pesticida.

Se cree que la combinación de una semilla transgénica que presenta bioactividad contra una plaga diana como resultado de la producción de una cantidad insecticida de un ARNb insecticida dentro de las células de la semilla transgénica o planta cultivada a partir de la semilla acoplada con tratamiento de la semilla con ciertas proteínas químicas o pesticidas proporciona ventajas sinérgicas inesperadas a semillas que tienen tal tratamiento, que incluyen eficacia inesperadamente superior para protección contra daño a la planta transgénica resultante por la plaga diana. En particular, se cree que el tratamiento de una semilla transgénica que puede expresar ciertas construcciones que forman moléculas de ARNb, cuya secuencia se deriva de una o más secuencias expresadas en un gusano de la raíz del maíz, con de 100 g a 400 g de ciertos pesticidas por 100 kg de semilla proporcionó protección inesperadamente superior contra el gusano de la raíz del maíz. Además, se cree que tales combinaciones también son eficaces para proteger las plantas de maíz emergentes contra el daño por gusano cortador negro. También se cree que las semillas de la presente invención tienen la propiedad de disminuir el coste de uso del pesticida, debido a que puede usarse menos del pesticida para obtener una cantidad de protección requerida que si no se usa la composición y procedimiento innovativo. Además, debido a que se usa menos pesticida y debido a que se aplica antes de plantar y sin una aplicación en campo separado, se cree que el procedimiento objeto es, por tanto, más seguro para el operario y para el entorno, y es potencialmente menos caro que los procedimientos convencionales.

Cuando se dice que algunos efectos son "sinérgicos", se indica que incluye los efectos sinérgicos de la combinación sobre la actividad (o eficacia) pesticida de la combinación del evento transgénico y el pesticida. Sin embargo, no se pretende que tales efectos sinérgicos se limiten a la actividad pesticida, pero que también deben incluir ventajas inesperadas tales como elevado alcance de la actividad, ventajoso perfil de actividades como se relaciona con el tipo y cantidad de reducción de daños, coste disminuido del pesticida y aplicación, distribución disminuida del pesticida en el medioambiente, exposición disminuida del pesticida del personal que lo produce, manipula y siembra las semillas de maíz, y otras ventajas conocidas para aquellos expertos en la materia.

Los pesticidas e insecticidas que son útiles en composiciones en combinación con los procedimientos y composiciones de la presente invención, que también incluyen como tratamientos y recubrimientos de semilla los procedimientos para usar tales composiciones, pueden encontrarse, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.551.962, la totalidad de la cual se incorpora en el presente documento por referencia.

Se ha encontrado que la presente invención es útil para proteger semillas y plantas contra una amplia variedad de plagas agrícolas, que incluyen insectos, ácaros, hongos, levaduras, mohos, bacterias, nematodos, malezas, y plantas parasíticas y saprofitas.

Se prefiere que los tratamientos y recubrimientos de semilla descritos en el presente documento vayan a usarse junto con semillas transgénicas de la presente invención, en particular por aplicación de un agente pesticida distinto de las moléculas de ARNb derivadas de las secuencias descritas en el presente documento como se expone en SEC ID Nº: 1 a SEC ID Nº: 143 y SEC ID Nº: 169 a SEC ID Nº: 174 como se exponen en el listado de secuencias, o los complementos de las mismas, a una semilla transgénica. Aunque se cree que los tratamientos de semilla pueden aplicarse a una semilla transgénica en cualquier estado fisiológico, se prefiere que la semilla esté en un estado suficientemente duradero que no incurra daño durante el procedimiento de tratamiento. Normalmente, la semilla sería una semilla que había sido recolectada del campo; sacada de la planta transgénica; y separada de cualquier otro material de planta de no semilla. La semilla también sería preferentemente biológicamente estable hasta el punto de que el tratamiento no produjera daño biológico a la semilla. En una realización, por ejemplo, el tratamiento puede aplicarse a semilla de maíz que ha sido cosechada, limpiada y secada a un contenido de humedad inferior al 15% en peso. En una realización alternativa, la semilla puede ser una que se ha secado y luego imprimado con agua y/u otro material y luego se ha vuelto a secar antes de o durante el tratamiento con el pesticida. Dentro de las limitaciones que se acaban de describir, se cree que el tratamiento puede aplicarse a la semilla en cualquier momento entre la cosecha de la semilla y la siembra de la semilla. Como se usa en el presente documento, el término "semilla sin sembrar" se indica para incluir semilla en cualquier periodo entre la cosecha de la semilla y la siembra de la semilla en la tierra con el fin de germinación y crecimiento de la planta.

Cuando se dice que la semilla sin sembrar se "trata" con el pesticida, tal tratamiento no pretende incluir aquellas prácticas en las que el pesticida se aplica a la tierra, en vez de a la semilla. Por ejemplo, en la presente invención no se considera que estén incluidos tratamientos tales como aplicación del pesticida en bandas, bandas en "T", o en surco, al mismo tiempo que la semilla se siembra.

El pesticida, o combinación de pesticidas, puede aplicarse "puro", es decir, sin ninguna dilución o componentes adicionales presentes. Sin embargo, el pesticida se aplica normalmente a las semillas en forma de una formulación de pesticida. Esta formulación puede contener uno o varios de otros componentes deseables que incluyen, pero no se limitan a, diluyentes líquidos, aglutinantes para servir de matriz para el pesticida, cargas para proteger las semillas durante condiciones de estrés, y plastificantes para mejorar la flexibilidad, adhesión y/o capacidad de extensión del recubrimiento.

Además, para formulaciones de pesticida aceitosas que contienen poca o ninguna carga, puede desearse añadir a la formulación agentes secantes tales como carbonato cálcico, caolín o arcilla de bentonita, perlita, tierra de diatomeas o cualquier otro material adsorbente. El uso de tales componentes en tratamientos de semilla se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.876.739. El experto puede seleccionar fácilmente componentes deseables para usar en la formulación de pesticida dependiendo del tipo de semilla que vaya a tratarse y el pesticida particular que se ha seleccionado. Además, pueden usarse formulaciones comerciales fácilmente disponibles de pesticidas conocidos, como se demuestra en los ejemplos más adelante.

Los pesticidas objeto pueden aplicarse a una semilla como un componente de un recubrimiento de semilla. Los procedimientos y composiciones de recubrimiento de semilla que se conocen en la técnica son útiles cuando se modifican mediante la adición de una de las realizaciones de la combinación de pesticidas de la presente invención. Tales procedimientos de recubrimiento y aparato para su aplicación se desvelan en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.918.413, 5.891.246, 5.554.445, 5.389.399, 5.107.787, 5.080.925, 4.759.945 y 4.465.017. Las composiciones de recubrimiento de semilla se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.939.356, 5.882.713, 5.876.739, 5.849.320, 5.834.447, 5.791.084, 5.661.103, 5.622.003, 5.580.544, 5.328.942, 5.300.127, 4.735.015, 4.634.587, 4.383.391, 4.372.080, 4.339.456, 4.272.417 y 4.245.432, entre otras.

Los pesticidas que son útiles en el recubrimiento son aquellos pesticidas que se describen en el presente documento. La cantidad de pesticida que se usa para el tratamiento de la semilla variará dependiendo del tipo de semilla y el tipo de principios activos, pero el tratamiento comprenderá poner en contacto las semillas con una cantidad de la combinación de pesticidas que es pesticidamente eficaz. Cuando los insectos son la plaga diana, esa cantidad será una cantidad de insecticida que es insecticidamente eficaz. Como se usa en el presente documento, una cantidad insecticidamente eficaz significa aquella cantidad de insecticida que combatirá plagas de insectos en el estado de crecimiento de larva o pupa, o reducirá o retardará coherentemente la cantidad de daño producido por plagas de insectos.

En general, la cantidad de pesticida que se aplica a la semilla en el tratamiento oscilará de 10 g a 2000 g de principio activo del pesticida por 100 kg de peso de semilla. Preferentemente, la cantidad de pesticida estará dentro del intervalo de 50 g a 1000 g de activo por 100 kg de semilla, más preferentemente dentro del intervalo de 100 g a 600 g de activo por 100 kg de semilla, e incluso más preferentemente dentro del intervalo de 200 g a 500 g de activo por 100 kg de peso de semilla. Alternativamente, se ha encontrado que se prefiere que la cantidad de pesticida sea superior a 60 g de principio activo del pesticida por 100 kg de semilla, y más preferentemente superior a 80 g por 100 kg de semilla.

Los pesticidas que se usan en el tratamiento no deben inhibir la germinación de la semilla y deben ser eficaces en proteger la semilla y/o la planta durante ese momento en el ciclo de vida del insecto diana en el que produce el daño a la semilla o planta. En general, el recubrimiento será eficaz durante aproximadamente 0 a 120 días después de la siembra.

Los pesticidas de la invención objeto pueden aplicarse a la semilla en forma de un recubrimiento. El uso de un recubrimiento es particularmente eficaz en acomodar altas cargas de pesticida, como puede requerirse para tratar plagas normalmente resistentes, tales como gusano de la raíz del maíz, mientras que al mismo tiempo se previene fitotoxicidad inaceptable debido al aumento de carga pesticida.

Los recubrimientos formados con una composición de pesticida contemplada en el presente documento son preferentemente capaces de efectuar una lenta tasa de liberación del pesticida por difusión o movimiento a través de la matriz al medio de alrededor.

Además de la capa de recubrimiento, la semilla puede tratarse con uno o más de los siguientes componentes: otros pesticidas que incluyen fungicidas y herbicidas; protectores herbicidas; fertilizantes y/o agentes de biocontrol. Estos componentes pueden añadirse como una capa separada o alternativamente pueden añadirse en la capa de recubrimiento de pesticida.

La formulación de pesticida puede aplicarse a las semillas usando técnicas y máquinas de recubrimiento convencionales, tales como técnicas de lecho fluidizado, el procedimiento de molino de rodillo, tratadores de semillas rotostáticos y recubridores de tambor. También pueden ser útiles otros procedimientos, tales como lechos de descarga. Las semillas pueden dimensionarse previamente antes del recubrimiento. Después del recubrimiento, las semillas se secan normalmente y luego se transfieren a una máquina de calibrado para el calibrado. Tales procedimientos se conocen en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "agente de control de insectos", o "agente de supresión génica" se refiere a una molécula de ARN particular que consiste en un primer segmento de ARN y un segundo segmento de ARN ligado por un tercer segmento de ARN. El primer y el segundo segmentos de ARN se encuentran dentro de la longitud de la molécula de ARN y son repeticiones sustancialmente invertidas entre sí y están ligados juntos por el tercer segmento de ARN. La complementariedad entre el primer y el segundo segmentos de ARN produce la capacidad de los dos segmentos para hibridarse *in vivo* e *in vitro* para formar una molécula bicatenaria, es decir, un tallo, ligado junto a un extremo de cada uno del primer y segundo segmentos por el tercer segmento que forma un lazo, de manera que la estructura entera forme

una estructura de tallo y lazo, o incluso estructuras que se hibridan más estrechamente pueden formar una estructura anudada de tallo-lazo. El primer y el segundo segmentos se corresponden invariablemente y no respectivamente con una secuencia sentido y antisentido con respecto al ARN diana transcrito a partir del gen diana en la plaga de insectos diana que se suprime por la ingestión de la molécula de ARNb. El agente de control de insectos también puede ser una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada (o aislada) y más específicamente moléculas de ácidos nucleicos o moléculas de fragmentos de ácido nucleico de las mismas de un ADN genómico (ADNg) o biblioteca de ADNc. Alternativamente, los fragmentos pueden comprender oligonucleótidos más pequeños que tienen de 15 a 250 residuos de nucleótidos, y más preferentemente 15 a 30 residuos de nucleótidos. El "agente de control de insectos" también puede referirse a una construcción de ADN que comprende las moléculas de ácidos nucleicos aisladas y purificadas o moléculas de fragmentos de ácido nucleico de las mismas de una biblioteca de ADNg o de ADNc. "Agente de control de insectos" puede referirse adicionalmente a un microorganismo que comprende una construcción de ADN tal que comprende las moléculas de ácidos nucleicos aisladas y purificadas o fragmento de moléculas de ácido nucleico de las mismas de una biblioteca de ADNg o de ADNc. Como se usa en el presente documento, el término "generar un agente de control de insectos" se refiere a los procedimientos de emplear las tecnologías de ADN recombinante fácilmente disponibles en la materia (por ejemplo, por Sambrook y col.) para preparar una construcción de ADN recombinante que transcribe las moléculas de ARNb o de ARNip estabilizado, para construir un vector que transcribe las moléculas de ARNb o de ARNip estabilizado, y/o para transformar y generar las células o los microorganismos que contienen las moléculas de ARNb o de ARNip estabilizado transcrito. El procedimiento de la presente invención proporciona la producción de un transcrito de ARNb, cuya secuencia de nucleótidos es sustancialmente homóloga a una secuencia de ARN elegida como diana codificada por una secuencia de nucleótidos diana dentro del genoma de una plaga de insectos diana.

Como se usa en el presente documento, el término "genoma" como se aplica a células de un insecto o un huésped engloba no solo ADN cromosómico encontrado dentro del núcleo, sino ADN de orgánulos encontrado dentro de componentes subcelulares de la célula. Por tanto, el ADN de la presente invención introducido en células de planta puede estar tanto cromosómicamente integrado como localizado en orgánulos. El término "genoma" como se aplica a bacterias engloba tanto el cromosoma como los plásmidos dentro de una célula huésped bacteriana. Por tanto, el ADN de la presente invención introducido en células huésped bacterianas puede estar tanto cromosómicamente integrado como localizado en plásmidos.

La inhibición de la expresión génica diana puede cuantificarse midiendo tanto el ARN diana endógeno como la proteína producida por traducción del ARN diana y las consecuencias de la inhibición pueden confirmarse por examen de las propiedades externas de la célula u organismo. Las técnicas para cuantificar ARN y proteínas son muy conocidas para un experto habitual en la materia. Están disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metrotrexato, fosfotricina, puromicina, espectinomina, rifampicina y tetraciclina.

En ciertas realizaciones preferidas, la expresión génica se inhibe al menos el 10%, preferentemente al menos el 33%, más preferentemente al menos el 50%, y todavía más preferentemente al menos el 80%. En realizaciones particularmente preferidas de la invención, la expresión génica se inhibe al menos el 80%, más preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, o por al menos el 99% dentro de células en el insecto de manera que tenga lugar una inhibición significativa. Inhibición significativa pretende referirse a la inhibición suficiente que produce un fenotipo detectable (por ejemplo, cese del crecimiento, parálisis o mortalidad de larvas) o una disminución detectable en ARN y/o proteína correspondiente al gen diana que se inhibe. Aunque en ciertas realizaciones de la invención la inhibición se produce en sustancialmente todas células del insecto, en otras realizaciones preferidas la inhibición se produce en solo un subconjunto de células que expresa el gen. Por ejemplo, si el gen que va a inhibirse desempeña una función esencial en células en el tubo digestivo del insecto, la inhibición del gen dentro de estas células es suficiente para ejercer un efecto perjudicial en el insecto.

Las ventajas de la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a, las siguientes: la facilidad de introducir ARNb en las células de insecto, la baja concentración de ARNb o ARNip que puede usarse, la estabilidad de ARNb o ARNip, y la eficacia de la inhibición. La capacidad para usar una baja concentración de un ARNb estabilizado evita varias desventajas de interferencia antisentido. La presente invención no se limita a uso *in vitro* o a composiciones de secuencia específica, a un conjunto particular de genes diana, una porción particular de la secuencia de nucleótidos del gen diana o un transgén particular o a un procedimiento de administración particular, a diferencia de algunas de las técnicas disponibles conocidas en la técnica, tal como antisentido y co-supresión. Además, la manipulación genética es posible en organismos que no son modelos genéticos clásicos.

En la práctica de la presente invención es importante que la presencia de las secuencias de nucleótidos que son transcritas de la construcción recombinante no sean ni perjudiciales para las células de la planta en las que se expresan según la invención, ni perjudiciales para la cadena alimenticia de un animal, y en particular seres humanos. Debido a que la producción de la planta puede proporcionarse para ingestión humana, la regulación por disminución de la expresión de la secuencia de nucleótidos diana se produce solo en el insecto.

Por tanto, con el fin de lograr la inhibición de un gen diana selectivamente dentro de una especie de insectos que se desea controlar, el gen diana debe presentar preferentemente un bajo grado de identidad de secuencias con genes correspondientes en una planta o un animal vertebrado. Preferentemente, el grado de la identidad de secuencias es inferior a aproximadamente el 80%. Más preferentemente, el grado de la identidad de secuencias es inferior a aproximadamente el 70%. Lo más preferentemente, el grado de la identidad de secuencias es inferior a aproximadamente el 60%.

Según una realización de la presente invención, se proporciona una secuencia de nucleótidos, para la que la expresión *in vitro* produce la transcripción de una secuencia de ARN estabilizado que es sustancialmente homóloga a una molécula de ARN de un gen elegido como diana en un insecto que comprende una secuencia de ARN codificada por una secuencia de nucleótidos dentro del genoma del insecto. Así, después de que el insecto ingiera la secuencia de ARN estabilizado incorporada en una dieta o pulverizada sobre una superficie de la planta, se afecta una regulación por disminución de la secuencia de nucleótidos correspondiente al gen diana en las células de un insecto diana. La secuencia de nucleótidos regulada por disminución en el insecto produce un efecto perjudicial en el mantenimiento, viabilidad, proliferación, reproducción e infectividad del insecto. Por tanto, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede ser útil en modular o controlar la infestación por una variedad de insectos.

Según otra realización de la presente invención, se proporciona una secuencia de nucleótidos, cuya expresión en una célula microbiana produce una transcripción de una secuencia de ARN que es sustancialmente homóloga a una molécula de ARN de un gen elegido como diana en un insecto que comprende una secuencia de ARN codificada por una secuencia de nucleótidos dentro del genoma del insecto. Así, después de que el insecto ingiera la secuencia de ARN estabilizado contenida en la célula del microorganismo, afectará la regulación por disminución de la secuencia de nucleótidos del gen diana en las células del insecto. La secuencia de nucleótidos regulada por disminución en el insecto produce un efecto perjudicial sobre el mantenimiento, viabilidad, proliferación, reproducción e infestación del insecto. Por tanto, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede ser útil en modular o controlar la infestación por una variedad de insectos.

Según otra realización más de la presente invención, se proporciona una secuencia de nucleótidos, cuya expresión en una célula de planta produce una transcripción de una secuencia de ARN que es sustancialmente homóloga a una molécula de ARN de un gen elegido como diana en un insecto que comprende una secuencia de ARN codificada por una secuencia de nucleótidos dentro del genoma del insecto. Así, después de que el insecto ingiera la secuencia de ARN estabilizado contenida en la célula de la planta, afectará la regulación por disminución de la secuencia de nucleótidos del gen diana en las células del insecto. La secuencia de nucleótidos regulada por disminución en el insecto produce un efecto perjudicial sobre el mantenimiento, viabilidad, proliferación, reproducción e infestación del insecto. Por tanto, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede ser útil en modular o controlar la infestación por una variedad de insectos en plantas.

Como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente homólogo” u “homología sustancial”, con referencia a una secuencia de ácidos nucleicos, se refiere a una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia codificante como se expone en cualquiera de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en cualquiera de SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias, o los complementos de las mismas. Secuencias que se hibridan bajo condiciones rigurosas con cualquiera de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o cualquiera de SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias, o los complementos de las mismas, son aquellas que permiten que tenga lugar un alineamiento antiparalelo entre las dos secuencias, y las dos secuencias son entonces capaces, bajo condiciones rigurosas, de formar enlaces de hidrógeno con bases correspondientes en la hebra opuesta para formar una molécula dúplex que es suficientemente estable bajo condiciones rigurosas para ser detectable usando procedimientos muy conocidos en la técnica. Tales secuencias sustancialmente homólogas tienen preferentemente del 65% al 70% de identidad de secuencias, o más preferentemente del 80% al 85% de identidad de secuencias, o lo más preferible del 90% al 95% de identidad de secuencias, al 99% de identidad de secuencias, con las secuencias de nucleótidos referentes como se exponen en cualquiera de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en cualquiera de SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 14 como se exponen en el listado de secuencias, o los complementos de las mismas.

Como se usa en el presente documento, el término “identidad de secuencias”, “similitud de secuencias” u “homología” se usa para describir relaciones de secuencias entre dos o más secuencias de nucleótidos. El porcentaje de “identidad de secuencias” entre dos secuencias se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) con respecto a la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base de ácidos nucleicos idéntica o residuo de aminoácido se produce en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencias. Una secuencia que es idéntica en cualquier posición en comparación con una secuencia de referencia se dice que es idéntica a la secuencia de referencia y viceversa. Una primera secuencia de nucleótidos cuando se observa en la dirección de 5' a 3' se dice que es un “complemento” de, o complementaria a, una segunda secuencia de nucleótidos o de referencia

observada en la dirección de 3' a 5' si la primera secuencia de nucleótidos presenta complementariedad completa con la segunda secuencia o de referencia. Como se usa en el presente documento, se dice que las moléculas de la secuencia de ácidos nucleicos presentan "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las secuencias leído de 5' a 3' es complementario a cada nucleótido de la otra secuencia cuando se lee de 3' a 5'. Una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de referencia presentará una secuencia idéntica a la secuencia del complemento inversa de la secuencia de nucleótidos de referencia. Estos términos y descripciones están todos bien definidos en la materia y son fácilmente entendidos para aquellos expertos habituales en la materia.

Como se usa en el presente documento, una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, normalmente 50 a 100, más normalmente 100 a 150, en el que una secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén óptimamente alineadas. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20% o menos con respecto a la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. Aquellos expertos en la materia deben referirse a los procedimientos detallados usados para alineamiento de secuencias en Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wis., EE.UU.) o se refieren a Ausubel y col. (1998) para una discusión detallada de análisis de secuencias.

El gen diana de la presente invención se deriva de una célula de insecto o alternativamente un gen extraño tal como una secuencia genética extraña de un virus, un hongo, un insecto o un nematodo, entre otros. Por "derivado" se pretende que una secuencia sea toda o una parte de la secuencia de nucleótidos que se produce naturalmente del gen diana del genoma de una célula de insecto, particularmente toda o una parte de la secuencia de nucleótidos que se produce naturalmente del ARNm rematado en los extremos, cortado y empalmado y poliadenilado expresado a partir de la secuencia de ADN que se produce naturalmente como se ha encontrado en la célula si el gen es un gen estructural, o la secuencia de toda o una parte de un ARN que es distinto de un gen estructural que incluye, pero no se limita a, un ARNt, un ARN catalítico, un ARN ribosómico y un micro-ARN. Una secuencia se deriva de una de estas secuencias de ARN que se producen naturalmente si la secuencia derivada se produce basándose en la secuencia de nucleótidos del ARN nativo, presenta del 80% al 100% de identidad de secuencias con la secuencia nativa y se hibrida con la secuencia nativa bajo condiciones de hibridación rigurosas. En una realización, el gen diana comprende una secuencia de nucleótidos como se expone en cualquiera de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en cualquiera de SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias, o los complementos de las mismas. Dependiendo del gen diana particular y la dosis de moléculas de ARNb administradas, este procedimiento puede proporcionar pérdida parcial o completa de la función para el gen diana, o cualquier nivel deseado de supresión entremedias.

La presente invención también proporciona una secuencia de ADN artificial que puede expresarse en una célula o microorganismo y que puede inhibir la expresión génica diana en una célula, tejido u órgano de un insecto, en el que la secuencia de ADN artificial comprende al menos una molécula de ADN que codifica una o más secuencias de nucleótidos diferentes, en el que cada una de las diferentes secuencias de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos sentido y una secuencia de nucleótidos antisentido conectadas por una secuencia de espaciador que codifica una molécula de ARNb de la presente invención. La secuencia de espaciador constituye parte de la secuencia de nucleótidos sentido o la secuencia de nucleótidos antisentido y se formará dentro de la molécula de ARNb entre las secuencias sentido y antisentido. La secuencia de nucleótidos sentido o la secuencia de nucleótidos antisentido son sustancialmente idénticas a la secuencia de nucleótidos del gen diana o un derivado de la misma o una secuencia complementaria a la misma. La molécula de ADN se coloca operablemente bajo el control de una secuencia de promotor que funciona en la célula, tejido u órgano del huésped que expresa el ADN para producir moléculas de ARNb. En una realización, la secuencia de ADN artificial puede derivarse de una secuencia de nucleótidos como se expone en, en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias.

La invención también proporciona una secuencia de ADN artificial para la expresión en una célula de una planta, y que, tras la expresión del ADN en ARN e ingestión por una plaga diana, consigue la supresión de un gen diana en una célula, tejido u órgano de una plaga de insectos. El ARNb comprende al menos una o múltiples secuencias de genes estructurales, en las que cada una de las secuencias de genes estructurales comprende una secuencia de nucleótidos sentido y una secuencia de nucleótidos antisentido conectadas por una secuencia de espaciador que forma un lazo dentro de las secuencias complementaria y antisentido. La secuencia de nucleótidos sentido o la secuencia de nucleótidos antisentido son sustancialmente idénticas a la secuencia de nucleótidos del gen diana, derivado de la misma o secuencia complementaria a la misma. La una o más secuencias de genes estructurales se colocan operablemente bajo el control de una o más secuencias de promotores, al menos una de las cuales es operable en la célula, tejido u órgano de un organismo procariota o eucariota, particularmente un insecto. En una realización, la secuencia de ADN artificial comprende de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143, o de SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se expone en el listado de secuencias o los complementos de las mismas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen que no se produce naturalmente", "secuencias codificantes que no se producen naturalmente", "secuencia artificial" o "secuencias codificantes sintéticas" para transcribir el ARNb o

ARNip de la presente invención o fragmentos de los mismos se refiere a aquellos preparados de un modo que implique cualquier tipo de aislamiento o manipulación genética que resulta de la preparación de una secuencia codificante que transcribe un ARNb o un ARNip de la presente invención o fragmentos de los mismos. Esto incluye aislamiento de la secuencia codificante de su estado que se produce naturalmente, manipulación de la secuencia codificante como por (1) inserción, delección o sustitución de nucleótidos, (2) inserción, delección o sustitución de segmentos, (3) síntesis química tal como química de fosforamido, mutagénesis específica para el sitio, truncación de la secuencia codificante, o cualquier otro procedimiento de manipulación o aislamiento.

La secuencia de genes que no se produce naturalmente o fragmento de la misma según este aspecto de la invención para control de WCR puede clonarse entre dos promotores específicos para tejido, tales como dos promotores específicos para raíz que son operables en una célula de planta transgénica, y expresarse en el mismo para producir ARNm en la célula de planta transgénica que forma moléculas de ARNb para el mismo. Las moléculas de ARNb contenidas en tejidos de planta son ingeridas por un insecto de manera que se logre la supresión prevista de la expresión génica diana.

La presente invención también proporciona un procedimiento para obtener un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos para producir un ARNb o ARNip de la presente invención. En una realización preferida, el procedimiento de la presente invención para obtener el ácido nucleico comprende: (a) sondar una biblioteca de ADNc o ADNg con una sonda de hibridación que comprende toda o una parte de una secuencia de nucleótidos o un homólogo de la misma de un insecto elegido como diana; (b) identificar un clon de ADN que se hibrida con la sonda de hibridación; (c) aislar el clon de ADN identificado en la etapa (b); y (d) secuenciar el ADNc o fragmento de ADNg que comprende el clon aislado en la etapa (c) en el que la molécula de ácido nucleico secuenciada transcribe toda o una porción sustancial de la secuencia de ácidos de nucleótidos de ARN o un homólogo de la misma.

En otra realización preferida, el procedimiento de la presente invención para obtener un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos para producir una porción sustancial de un ARNb o ARNip de la presente invención comprende: (a) sintetizar un primer y un segundo cebadores de oligonucleótidos correspondientes a una parte de una de las secuencias de nucleótidos de un insecto elegido como diana; y (b) amplificar un ADNc o inserto de ADNg presente en un vector de clonación usando el primer y segundo cebadores de oligonucleótidos de la etapa (a) en el que la molécula de ácido nucleico amplificada transcribe una porción sustancial de una porción sustancial de un ARNb o ARNip de la presente invención.

En la práctica de la presente invención, un gen diana puede derivarse de un gusano de la raíz del maíz (CRW), tal como un WCR o un SCR, o cualquier especie de insectos que produzca daños a las plantas de cultivo y posteriores pérdidas de rendimiento. Los presentes inventores contemplan que pueden emplearse varios criterios en la selección de genes diana preferidos. El gen es uno cuyo producto de proteína tiene una rápida tasa de renovación, de manera que la inhibición de ARNb producirá una rápida disminución en los niveles de proteína. En ciertas realizaciones es ventajoso seleccionar un gen para que una pequeña disminución en el nivel de expresión produzca efectos perjudiciales para el insecto. Si se desea elegir como diana una amplia variedad de especies de insectos, se selecciona un gen que está altamente conservado a través de estas especies. En cambio, con el fin de conferir especificidad, en ciertas realizaciones de la invención se selecciona un gen que contiene regiones que están escasamente conservadas entre especies de insectos individuales, o entre insectos y otros organismos. En ciertas realizaciones puede desearse seleccionar un gen que no tenga homólogos conocidos en otros organismos.

Como se usa en el presente documento, el término "derivado de" se refiere a una secuencia de nucleótidos especificada que puede obtenerse a partir de una fuente especificada particular o especies, no obstante no necesariamente directamente a partir de la fuente especificada o especies.

En una realización se selecciona un gen que se expresa en el intestino del insecto. La elección de genes como diana que se expresan en el intestino evita el requisito de que el ARNb se propague dentro del insecto. Genes diana para su uso en la presente invención pueden incluir, por ejemplo, aquellos que comparten homología sustancial con las secuencias de nucleótidos de genes expresados en el intestino conocidos que codifican componentes de proteína de la V-ATPasa de protones de la membrana plasmática (Dow y col., 1997, J. Exp. Biol., 200:237-245; Dow, Bioenerg. Biomemb., 1999, 31:75-83). Este complejo de proteína es el único energizante del transporte de iones epiteliales y es responsable de la alcalinización de la luz del intestino medio. La V-ATPasa también se expresa en el túbulo de Malpighi, un crecimiento hacia afuera del intestino posterior del insecto que funciona en el equilibrio de fluidos y la desintoxicación de compuestos extraños de un modo análogo a un órgano de riñón de un mamífero.

En otra realización se selecciona un gen que participa esencialmente en el crecimiento, desarrollo y reproducción de un insecto. Genes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un gen CHD3 y un gen  $\beta$ -tubulina. El gen CHD3 en *Drosophila melanogaster* codifica una proteína con actividad de ADN helicasa dependiente de ATP que participa en el ensamblaje/desensamblaje de cromatina en el núcleo. Se han encontrado secuencias similares en diversos organismos tales como *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* y *Saccharomyces cerevisiae*. La familia del gen beta-tubulina codifica proteínas asociadas a microtúbulos que son un constituyente del citoesqueleto celular. Secuencias relacionadas

se encuentran en diversos organismos tales como *Caenorhabditis elegans* y *Manduca sexta*.

Otros genes diana para su uso en la presente invención pueden incluir, por ejemplo, aquellos que desempeñan funciones importantes en la viabilidad, crecimiento, desarrollo, reproducción e infectividad. Estos genes diana pueden ser uno de los genes de mantenimiento, factores de transcripción y genes específicos para insecto o mutaciones por inactivación letales en *Drosophila*. Los genes diana para su uso en la presente invención también pueden ser aquellos que son de otros organismos, por ejemplo, de un nematodo (por ejemplo, *C. elegans*). Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos para su uso en la presente invención también pueden derivarse de genes de planta, virales, bacterianos o fúngicos cuyas funciones se han establecido de la bibliografía y cuyas secuencias de nucleótidos comparten similitud sustancial con los genes diana en el genoma de un insecto. Según un aspecto de la presente invención para el control de WCR, las secuencias diana pueden derivarse esencialmente del insecto WCR elegido como diana. Algunas de las secuencias diana a modo de ejemplo de la biblioteca de ADNc de WCR que codifican proteínas de *D. v. virgifera* o fragmentos de las mismas que son homólogos de proteínas conocidas pueden encontrarse en el Listado de secuencias.

Se conocen moléculas de ácidos nucleicos de *D. virgifera* que codifican homólogos de proteínas conocidas (Andersen y col., solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 10/205.189).

Aunque las secuencias descritas en Andersen y col. son principalmente en referencia a WCR, se prefiere en la práctica de la invención usar segmentos de ADN cuyas secuencias presenten al menos el 80% de identidad, o al menos el 90% de identidad, o al menos el 95% de identidad, o al menos el 98% de identidad, o al menos el 100% de identidad con secuencias correspondientes a genes o secuencias codificantes dentro de la plaga para la que se desea el control. Secuencias idénticas menos del 80% a un gen diana son menos eficaces. La inhibición es específica para el gen o genes de la plaga, cuya secuencia se corresponde con el ARNb. La expresión de genes sin relacionar no está afectada. Esta especificidad permite la elección como diana selectiva de especies de plagas, no produciendo efecto sobre otros organismos expuestos a las composiciones de la presente invención.

Un segmento de ADN para su uso en la presente invención tiene al menos de 19 a 23, o 23 a 100 nucleótidos, pero menos de 2000 nucleótidos, de longitud.

La invención no se limita a los genes específicos descritos en el presente documento, pero engloba cualquier gen cuya inhibición ejerza un efecto perjudicial sobre una plaga de insectos.

Para muchos de los insectos que son posibles dianas para el control por la presente invención puede haber información limitada referente a las secuencias de la mayoría de los genes o el fenotipo resultante de mutación de genes particulares. Por tanto, los presentes inventores contemplan que la selección de genes apropiados de plagas de insectos para su uso en la presente invención puede llevarse a cabo mediante el uso de información disponible del estudio de los genes correspondientes en un organismo modelo como en *Drosophila*, en alguna otra especie de insectos, o incluso en una especie de nematodo, en una especie fúngica, en una especie de planta, en la que los genes se han caracterizado. En algunos casos será posible obtener la secuencia de un gen correspondiente de un insecto diana buscando en bases de datos tales como GenBank usando tanto el nombre del gen como la secuencia de, por ejemplo, *Drosophila*, otro insecto, un nematodo, un hongo o una planta a partir de la cual se ha clonado el gen. Una vez se obtiene la secuencia puede usarse PCR para amplificar un segmento apropiadamente seleccionado del gen en el insecto para su uso en la presente invención.

Con el fin de obtener un segmento de ADN del gen correspondiente en una especie de insectos, se diseñan cebadores de PCR basándose en la secuencia como se ha encontrado en WCR u otros insectos a partir de los cuales se ha clonado el gen. Los cebadores se diseñan para amplificar un segmento de ADN de longitud suficiente para su uso en la presente invención. Se prepara ADN (tanto ADN genómico como ADNc) a partir de la especie de insectos, y los cebadores de PCR se usan para amplificar el segmento de ADN. Las condiciones de amplificación se seleccionan de manera que se produzca la amplificación, aunque los cebadores no coincidan exactamente con la secuencia diana. Alternativamente, el gen (o una parte del mismo) puede clonarse de una biblioteca de ADNg o de ADNc preparada a partir de las especies de plagas de insectos, usando el gen de WCR u otro gen de insecto conocido como sonda. Las técnicas para realizar PCR y clonación de bibliotecas son conocidas. Más detalles del procedimiento por el que segmentos de ADN de las especies de plagas de insectos diana pueden aislarse basándose en la secuencia de genes previamente clonados de WCR u otra especie de insectos se proporcionan en los ejemplos. Un experto habitual en la materia reconocerá que puede usarse una variedad de técnicas para aislar segmentos de genes de las especies de plagas de insectos que se corresponden con genes previamente aislados de otras especies.

Los insectos que puede producir daño en plantas generalmente pertenecen a tres categorías basándose en su procedimientos de alimentación y estas tres categorías son, respectivamente, insectos masticadores, succionadores y perforadores que pertenecen a los órdenes *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*, *Orthoptera*, *Heteroptera*, *Ctenophalides*, *Arachnidiae* e *Hymenoptera*. Los insectos masticadores que comen tejido de planta tal como raíces, hojas, flores, brotes y ramas pequeñas, producen el mayor daño. Ejemplos de esta gran categoría de insectos incluyen escarabajos y sus

larvas. WCR y SCR pertenecen a los insectos masticadores. Sus larvas se alimentan de raíces de una planta, en particular, una planta de maíz, y los adultos principalmente del follaje. Los genes derivados de WCR o SCR o de una especie cualquiera de los órdenes anteriormente enumerados pueden considerarse dianas para realizar la presente invención.

- 5 Se ha encontrado que el presente procedimiento es útil para proteger semillas y plantas contra una amplia variedad de plagas agrícolas, que incluyen insectos, ácaros, hongos, levaduras, mohos, bacterias, nematodos, malezas, y plantas parasíticas y saprofitas.

Cuando un insecto es la plaga diana para la presente invención, tales plagas incluyen, pero no se limitan a:

- 10 del orden de los lepidópteros, por ejemplo, *Acleris* spp., *Adoxophyes* spp., *Aegeria* spp., *Agrotis* spp., *Alabama argillaceae*, *Amylois* spp., *Anticarsia gemmatalis*, *Archips* spp., *Argyrotaenia* spp., *Autographa* spp., *Busseola fusca*, *Cadra cautella*, *Carposina nipponensis*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocrocis* spp., *Cnephasia* spp., *Cochyliis* spp., *Coleophora* spp., *Crocidolomia binotalis*, *Cryptophlebia leucotreta*, *Cydia* spp., *Diatraea* spp., *Diparopsis castanea*, *Earias* spp., *Ephestia* spp., *Eucosma* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Grapholita* spp., *Hedya nubiferana*, *Heliothis* spp., *Hellula undalis*, *Hyphantria cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Leucoptera scitella*, *Lithocollethis* spp., *Lobesia botrana*, *Lymantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma* spp., *Mamestra brassicae*, *Manduca sexta*, *Operophtera* spp., *Ostrinia Nubilalis*, *Pammene* spp., *Pandemis* spp., *Panolis flammea*, *Pectinophora gossypiella*, *Phthorimaea operculella*, *Pieris rapae*, *Pieris* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Scirpophaga* spp., *Sesamia* spp., *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Synanthedon* spp., *Thaumetopoea* spp., *Tortrix* spp., *Trichoplusia ni* y *Yponomeuta* spp.;
- 20 del orden de los coleópteros, por ejemplo, *Agriotes* spp., *Anthonomus* spp., *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites* spp., *Curculio* spp., *Dermestes* spp., *Diabrotica* spp., *Epilachna* spp., *Eremnus* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptrus* spp., *Melolontha* spp., *Oryzaephilus* spp., *Otiorhynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes* spp., *Rhizopertha* spp., *Scarabeidae*, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp., *Tenebrio* spp., *Tribolium* spp. y *Trogoderma* spp.;
- 25 del orden de los ortópteros, por ejemplo, *Blatta* spp., *Blattella* spp., *Gryllotalpa* spp., *Leucophaea maderae*, *Locusta* spp., *Periplaneta* spp., y *Schistocerca* spp.;
- del orden de los isópteros, por ejemplo, *Reticulitermes* spp.;
- del orden de los psocópteros, por ejemplo, *Liposcelis* spp.;
- 30 del orden de los anopluros, por ejemplo, *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Pemphigus* spp. y *Phylloxera* spp.;
- del orden de los malófagos, por ejemplo, *Damalinea* spp. y *Trichodectes* spp.;
- del orden de los tisanópteros, por ejemplo, *Franklinella* spp., *Hercinothrips* spp., *Taeniothrips* spp., *Thrips palmi*, *Thrips tabaci* y *Scirtothrips aurantii*;
- 35 del orden de los heterópteros, por ejemplo, *Cimex* spp., *Distantiella theobroma*, *Dysdercus* spp., *Euchistus* spp., *Eurygaster* spp., *Leptocoris* spp., *Nezara* spp., *Piesma* spp., *Rhodnius* spp., *Sahlbergella singularis*, *Scotinophara* spp., *Triatoma* spp., *Miridae* family spp. tales como *Lygus hesperus* y *Lygus lineolaris*, *Lygaeidae* family spp. tales como *Blissus leucopterus* y *Pentatomidae* family spp.;
- 40 del orden de los homópteros, por ejemplo, *Aleurothrix floccosus*, *Aleyrodes brassicae*, *Aonidiella* spp., *Aphididae*, *Aphis* spp., *Aspidiotus* spp., *Bemisia tabaci*, *Ceroplaster* spp., *Chrysomphalus aonidium*, *Chrysomphalus dictyospermi*, *Coccus hesperidum*, *Empoasca* spp., *Eriosoma larigerum*, *Erythroneura* spp., *Gascardia* spp., *Laodelphax* spp., *Lacanium corni*, *Lepidosaphes* spp., *Macrosiphus* spp., *Myzus* spp., *Nehotettix* spp., *Nilaparvata* spp., *Paratoria* spp., *Pemphigus* spp., *Planococcus* spp., *Pseudaulacaspis* spp., *Pseudococcus* spp., *Psylla* spp., *Pulvinaria aethiopica*, *Quadraspidiotus* spp., *Rhopalosiphum* spp., *Saissetia* spp., *Scaphoideus* spp., *Schizaphis* spp., *Sitobion* spp., *Trialeurodes vaporariorum*, *Trioza erytrae* y *Unaspis citri*;
- 45 del orden de los himenópteros, por ejemplo, *Acromyrmex*, *Atta* spp., *Cephus* spp., *Diprion* spp., *Diprionidae*, *Gilpinia polytoma*, *Hoplocampa* spp., *Lasius* spp., *Monomorium pharaonis*, *Neodiprion* spp., *Solenopsis* spp. y *Vespa* spp.;
- 50 del orden de los dípteros, por ejemplo, *Aedes* spp., *Antherigona soccata*, *Bibio hortulanus*, *Calliphora erythrocephala*, *Ceratitis* spp., *Chrysomyia* spp., *Culex* spp., *Cuterebra* spp., *Dacus* spp., *Drosophila melanogaster*, *Fannia* spp., *Gastrophilus* spp., *Glossina* spp., *Hypoderma* spp., *Hyppobosca* spp., *Liriomyza* spp., *Lucilia* spp., *Melanagromyza* spp., *Musca* spp., *Oestrus* spp., *Orseolia* spp., *Oscinella frit*, *Pegomyia hyoscyami*, *Phorbia* spp.,

*Rhagoletis pomonella*, *Sciara* spp., *Stomoxys* spp., *Tabanus* spp., *Tannia* spp. y *Tipula* spp.,

del orden de los sifonápteros, por ejemplo, *Ceratophyllus* spp. y *Xenopsylla cheopis* y

del orden de los tisanuros, por ejemplo, *Lepisma saccharina*.

5 Se ha encontrado que la presente invención es particularmente eficaz cuando la plaga de insectos es una *Diabrotica* spp., y especialmente cuando la plaga es *Diabrotica virgifera virgifera* (gusano de la raíz del maíz occidental, WCR), *Diabrotica barberi* (gusano de la raíz del maíz del norte, NCR), *Diabrotica virgifera zea* (gusano de la raíz del maíz mejicano, MCR), *Diabrotica balteata* (gusano de la raíz del maíz brasileño, BZR) o complejo de gusano de la raíz del maíz brasileño (BCR) que consiste en *Diabrotica viridula* y *Diabrotica speciosa*, o *Diabrotica undecimpunctata howardii* (gusano de la raíz del maíz del sur, SCR).

10 La presente invención también es particularmente eficaz para controlar especies de insectos que perforan y/o succionan los fluidos de las células y tejidos de plantas, que incluyen, pero no se limitan a, chinches apestosos (especies de la familia *Pentatomidae*) y chinches de las plantas en la familia de *Miridae* tales como chinches de plantas manchadas occidentales (especies de *Lygus hesperus*), chinches de plantas manchadas (especies de *Lygus lineolaris*) y chinches de las leguminosas pálidos (*Lygus elisus*).

15 Modificaciones de los procedimientos desvelados en el presente documento también son sorprendentemente particularmente útiles en controlar plagas de cultivos dentro del orden de los lepidópteros.

20 La presente invención proporciona moléculas de ARNb o de ARNip estabilizado para el control de infestaciones de insectos. Las secuencias de nucleótidos de ARNb o ARNip comprenden hebras dobles de ribonucleótido polimerizado y pueden incluir modificaciones a tanto el esqueleto de fosfato-azúcar como al nucleósido. Pueden confeccionarse modificaciones en la estructura del ARN para permitir inhibición genética específica.

25 En una realización, las moléculas de ARNb pueden modificarse mediante un proceso enzimático, así las moléculas de ARNip pueden generarse. El ARNip puede mediar eficazmente en el efecto de regulación por disminución para algunos genes diana en algunos insectos. Este proceso enzimático puede llevarse a cabo utilizando una enzima ARNsa III o una enzima DICER, presente en las células de un insecto, un animal vertebrado, un hongo o una planta en la ruta de ARNi de eucariotas (Elbashir y col., 2002, Methods, 26(2):199-213; Hamilton y Baulcombe, 1999, Science 286:950-952). Este procedimiento también puede utilizar una DICER o ARNsa III recombinante introducida en las células de un insecto diana mediante técnicas de ADN recombinante que son fácilmente conocidas para el experto en la materia. Tanto la enzima DICER como la ARNsa III, que se producen naturalmente en un insecto o que se preparan mediante técnicas de ADN recombinante, escinden hebras de ARNb más grandes en oligonucleótidos más pequeños. Las enzimas DICER cortan específicamente las moléculas de ARNb en trozos de ARNip teniendo cada uno 19-25 nucleótidos de longitud mientras que las enzimas ARNsa III normalmente escinden las moléculas de ARNb en ARNip de 12-15 pares de bases. Las moléculas de ARNip producidas por cualquiera de las enzimas tienen de 2 a 3 nucleótidos protuberantes en 3' , y extremos fosfato en 5' e hidroxilo en 3'. Las moléculas de ARNip generadas por la enzima ARNsa III son las mismas que aquellas producidas por enzimas Dicer en la ruta de ARNi de eucariotas y de ahí que entonces se elijan como diana y se degraden por un mecanismo de degradación de ARN celular inherente después del cual se desenrollan posteriormente, se separan en ARN monocatenario y se hibridan con las secuencias de ARN transcritas por el gen diana. Este procedimiento produce la eficaz degradación o eliminación de la secuencia de ARN codificada por la secuencia de nucleótidos del gen diana en el insecto. El resultado es el silenciamiento de una secuencia de nucleótidos particularmente elegida como diana dentro del insecto. Descripciones detalladas de procesos enzimáticos pueden encontrarse en Hannon (2002, Nature, 418:244-251).

30 La inhibición de un gen diana usando la tecnología de ARNb estabilizado de la presente invención es específica para secuencias en las que secuencias de nucleótidos correspondientes a la región de dúplex del ARN son elegidas como diana para la inhibición genética. Para la inhibición se prefiere ARN que contiene una secuencia de nucleótidos idéntica a una parte del gen diana. También se ha encontrado que las secuencias de ARN con inserciones, deleciones y mutaciones puntuales individuales con respecto a la secuencia diana también son eficaces para inhibición. En la realización de la presente invención se prefiere que el ARNb inhibidor y la porción del gen diana compartan al menos el 80% de identidad de secuencias, o el 90% de identidad de secuencias, o el 95% de identidad de secuencias, o el 99% de identidad de secuencias, o incluso el 100% de identidad de secuencias. Alternativamente, la región de dúplex del ARN puede definirse funcionalmente como una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con una parte del gen diana transcrito. Una secuencia de longitud inferior a completa que presenta una mayor homología compensa una secuencia más larga menos homóloga. La longitud de las secuencias de nucleótidos idénticas puede ser al menos 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o al menos 1000 bases. Normalmente debe usarse una secuencia de más de 20-100 nucleótidos, aunque se preferiría una secuencia de más de 200-300 nucleótidos, y una secuencia de más de 500-1000 nucleótidos sería especialmente preferida dependiendo del tamaño del gen diana. La invención tiene la ventaja de poder tolerar variaciones de secuencia que podrían esperarse debido a mutación genética, polimorfismo de cepas o divergencia evolutiva. La molécula de ácido

nucleico introducida puede no necesitar tener homología absoluta, puede no necesitar ser de longitud completa, con respecto a tanto el producto de transcripción primario como al ARNm completamente procesado del gen diana. Por tanto, aquellos expertos en la materia necesitan darse cuenta de que, como se ha desvelado en el presente documento, no se requiere el 100% de la identidad de secuencias entre el ARN y el gen diana para poner en práctica la presente invención.

- 5 Las moléculas de ARNb pueden sintetizarse tanto *in vivo* como *in vitro*. El ARNb puede formarse por una única hebra de ARN autocomplementaria o a partir de dos hebras de ARN complementarias. La ARN polimerasa endógena de la célula puede mediar en la transcripción *in vivo*, o puede usarse ARN polimerasa clonada para transcripción *in vivo* o *in vitro*. La inhibición puede elegirse como diana por transcripción específica en un órgano, tejido o tipo de célula; estimulación de una condición medioambiental (por ejemplo, infección, estrés, temperatura, inductores químicos); y/o transcripción por ingeniería en una etapa o edad de desarrollo. Las hebras de ARN pueden o pueden no estar poliadeniladas; las hebras de ARN pueden o pueden no ser capaces de ser traducidas en un polipéptido por una aparato traduccional de células.

10 El ARN, ARNb, ARNip o miARN de la presente invención puede producirse químicamente o enzimáticamente por un experto en la materia mediante reacciones manuales o automatizadas o *in vivo* en otro organismo. El ARN también puede producirse por síntesis orgánica parcial o total; cualquier ribonucleótido modificado puede introducirse por síntesis enzimática u orgánica *in vitro*. El ARN puede sintetizarse por una ARN polimerasa celular o una ARN polimerasa de bacteriófago (por ejemplo, T3, T7, SP6). El uso y producción de una construcción de expresión se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, documento WO 97/32016; patentes de EE.UU. n° 5.593.874, 5.698.425, 5.712.135, 5.789.214 y 5.804.693). Si se sintetiza químicamente o por síntesis enzimática *in vitro*, el ARN puede purificarse antes de la introducción en la célula. Por ejemplo, el ARN puede purificarse de una mezcla por extracción con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía, o una combinación de los mismos. Alternativamente, el ARN puede usarse sin o con un mínimo de purificación para evitar pérdidas debidas al procesamiento de muestras. El ARN puede secarse para almacenamiento o disolverse en una disolución acuosa. La disolución puede contener tampones o sales para promover la hibridación, y/o estabilización de las hebras dúplex. Para transcripción de un transgén *in vivo* o una construcción de expresión, una región reguladora (por ejemplo, promotor, potenciador, silenciador y poliadenilación) puede usarse para transcribir la hebra (o hebras) de ARN. Por tanto, en una realización, las secuencias de nucleótidos para su uso en producir las moléculas de ARN pueden ligarse operativamente a una o más secuencias de promotores funcionales en un microorganismo, un hongo o una célula huésped de planta. Idealmente, las secuencias de nucleótidos se colocan bajo el control de un promotor endógeno, normalmente residente en el genoma huésped. La secuencia de nucleótidos de la presente invención, bajo el control de una secuencia de promotor operativamente ligada, puede flanquearse adicionalmente por secuencias adicionales que afectan ventajosamente su transcripción y/o la estabilidad de un transcrito resultante. Tales secuencias se localizan generalmente en la dirección 5' del promotor operativamente ligado y/o en la dirección 3' del extremo 3' de la construcción de expresión y pueden producirse tanto en la dirección 5' del promotor como en la dirección 3' del extremo 3' de la construcción de expresión, aunque también se contempla solo una secuencia en la dirección 5' tal.

35 En otra realización, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede comprender una repetición invertida separada por una "secuencia de espaciador". La secuencia de espaciador puede ser una región que comprende cualquier secuencia de nucleótidos que facilita la formación de estructura secundaria entre cada repetición, cuando esto se requiere. En una realización de la presente invención, la secuencia de espaciador es parte de la secuencia codificante sentido o antisentido para ARNm. La secuencia de espaciador puede comprender alternativamente cualquier combinación de nucleótidos u homólogos de los mismos que pueden ligarse covalentemente a una molécula de ácido nucleico. La secuencia de espaciador puede comprender una secuencia de nucleótidos de al menos 10-100 nucleótidos de longitud, o alternativamente al menos 100-200 nucleótidos de longitud, al menos aproximadamente 200-400 nucleótidos de longitud, o al menos 400-500 nucleótidos de longitud.

45 Con el fin de la presente invención, las moléculas de ARNb o de ARNip pueden obtenerse a partir de CRW por amplificación de la cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias de genes de CRW diana derivadas de una biblioteca de ADNg o de ADNc de gusano de la raíz del maíz o porciones de la misma. Las larvas de WCR pueden prepararse usando procedimientos conocidos para el experto habitual en la materia y puede extraerse ADN/ARN. Pueden usarse larvas con diversos tamaños que oscilan de CRW del 1<sup>er</sup> estadio a CRW completamente crecidas con el fin de la presente invención para la extracción de ADN/ARN. Las bibliotecas de ADN genómico o de ADNc generadas a partir de WCR puede usarse para amplificación por PCR para la producción del ARNb o ARNip.

Los genes diana pueden entonces amplificarse por PCR y secuenciarse usando los procedimientos fácilmente disponibles en la materia. Un experto en la materia puede ser capaz de modificar las condiciones de PCR para garantizar la óptima formación de productos de PCR. El producto de PCR confirmado puede usarse como molde para la transcripción *in vitro* para generar ARN sentido y antisentido con los promotores mínimos incluidos.

55 Los presentes inventores contemplan que secuencias de ácidos nucleicos identificadas y aisladas de cualquier especie de insectos en el reino de los insectos puede usarse en la presente invención para el control de WCR y otros insectos elegidos como diana. En un aspecto de la presente invención, el ácido nucleico puede derivarse de una especie de una

especie de coleóptero. Específicamente, el ácido nucleico puede derivarse de escarabajos de las hojas que pertenecen al género *Diabrotica* (coleópteros, crisomélidos) y más específicamente las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención pueden derivarse de especies del grupo *virgifera*. Lo más específicamente, las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención pueden derivarse de *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte que se denomina normalmente WCR. Los ácidos nucleicos aislados pueden ser útiles, por ejemplo, en identificar un gen diana y en construir un vector recombinante que produce ARNb o ARNip estabilizados de la presente invención para proteger plantas de infestaciones de insectos de WCR.

Por tanto, en una realización, la presente invención comprende secuencias de nucleótidos aisladas y purificadas de WCR o *Lygus* que pueden usarse como agentes de control de insectos. La secuencias de nucleótidos aisladas y purificadas comprenden aquellas como se exponen en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias.

Los ácidos nucleicos de WCR u otros insectos que pueden usarse en la presente invención también pueden comprender moléculas de ácidos nucleicos de Unigenes y de EST aisladas y sustancialmente purificadas o moléculas de fragmentos de ácidos nucleicos de las mismas. Las moléculas de ácidos nucleicos de EST pueden codificar porciones significativas de, o de hecho principalmente de, los polipéptidos. Alternativamente, los fragmentos pueden comprender oligonucleótidos más pequeños que tienen de 15 a 250 residuos de nucleótidos, y más preferentemente 15 a 30 residuos de nucleótidos. Alternativamente, las moléculas de ácidos nucleicos para su uso en la presente invención pueden ser de bibliotecas de ADNc de WCR, de *Lygus*, o de cualquier otra especie de plagas de invertebrados.

Como se usa en el presente documento, la expresión “un ácido nucleico sustancialmente purificado”, “una secuencia artificial”, “un ácido nucleico aislado y sustancialmente purificado” o “una secuencia de nucleótidos aislada y sustancialmente purificada” se refiere a un ácido nucleico que ya no está acompañado de algunos de los materiales con los que está asociado en su estado natural o con una estructura de ácidos nucleicos que no es idéntica a la de cualquier ácido nucleico que se produce naturalmente. Ejemplos de un ácido nucleico sustancialmente purificado incluyen: (1) ADN que tienen la secuencia de parte de moléculas de ADN genómico que se producen naturalmente, pero que no están flanqueadas por dos secuencias codificantes que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en el que se produce naturalmente; (2) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procarionta o eucariota de un modo tal que la molécula resultante no sea idéntica a ningún vector o ADN genómico que se produce naturalmente; (3) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o un fragmento de restricción; (4) ADN recombinantes; y (5) ADN sintéticos. Un ácido nucleico sustancialmente purificado también puede comprender uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético.

Las moléculas de ácidos nucleicos y fragmentos de las mismas de WCR, *Lygus* u otras especies de plagas de invertebrados pueden emplearse para obtener otras moléculas de ácidos nucleicos de otras especies para su uso en la presente invención para producir moléculas de ARNb y de ARNip deseadas. Tales moléculas de ácidos nucleicos incluyen las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la secuencia codificante completa de una proteína y promotores y secuencias flanqueantes de tales moléculas. Además, tales moléculas de ácidos nucleicos incluyen moléculas de ácidos nucleicos que codifican miembros de la familia del gen. Tales moléculas pueden obtenerse fácilmente usando las moléculas de ácidos nucleicos anteriormente descritas o fragmentos de las mismas para cribar bibliotecas de ADNc o de ADNg obtenidas de *D. v. virgifera* o de *Lygus hesperus*. Los procedimientos para formar tales bibliotecas son muy conocidos en la técnica.

Las moléculas de ácidos nucleicos y fragmentos de las mismas de WCR o *Lygus* también pueden emplearse para obtener otras moléculas de ácidos nucleicos tales como homólogos de ácido nucleico para su uso en la presente invención para producir moléculas de ARNb y de ARNip deseadas. Tales homólogos incluyen las moléculas de ácidos nucleicos que codifican, por completo o en parte, homólogos de proteína de otras especies, plantas u otros organismos. Tales moléculas pueden obtenerse fácilmente usando las moléculas de ácidos nucleicos anteriormente descritas o fragmentos de las mismas para cribar bibliotecas de EST, ADNc o ADNg. Los procedimientos para formar tales bibliotecas son muy conocidos en la técnica. Tales moléculas homólogas pueden diferenciarse en sus secuencias de nucleótidos de aquellas encontradas en una o más de, en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias o complementos de las mismas desvelados en el presente documento, debido a que no se necesita complementariedad completa para hibridación estable. Estas moléculas de ácidos nucleicos también incluyen moléculas que, aunque pueden hibridarse específicamente con las moléculas de ácidos nucleicos, pueden carecer de complementariedad completa. En una realización particular, los procedimientos para 3' o 5' RACE pueden usarse para obtener tales secuencias (Frohman, M.A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:8998-9002 (1988); Ohara, O. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:5673-5677 (1989)). En general, cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos anteriormente descritas o fragmentos pueden usarse para generar ARNb o ARNip que son adecuados para su uso en una dieta, en una mezcladora por pulverización o en una construcción de ADN recombinante de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término “secuencia codificante”, “secuencia de nucleótidos estructural” o “molécula de ácido nucleico estructural” se refiere a una secuencia de nucleótidos que se traduce en un polipéptido, normalmente mediante ARNm, cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de iniciación de la traducción en el extremo 5' y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, secuencias de ADN genómico, ADNc, EST y de nucleótidos recombinantes.

El término “ADN recombinante” o “secuencia de nucleótidos recombinantes” se refiere a ADN que contiene una modificación genéticamente manipulada mediante manipulación mediante mutagénesis y enzimas de restricción.

Las moléculas de ácidos nucleicos o fragmento de las moléculas de ácidos nucleicos u otras moléculas de ácidos nucleicos de WCR pueden hibridarse específicamente con otras moléculas de ácidos nucleicos en ciertas circunstancias. Como se usa en el presente documento, se dice que dos moléculas de ácidos nucleicos pueden hibridarse específicamente entre sí si las dos moléculas pueden formar una estructura de ácidos nucleicos bicatenaria antiparalela. Una molécula de ácido nucleico se dice que es el complemento de otra molécula de ácido nucleico si presentan complementariedad completa. Se dice que dos moléculas son “mínimamente complementarias” si pueden hibridarse con otra con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan hibridadas con otra bajo al menos condiciones de “baja rigurosidad” convencionales. Similarmente, se dice que las moléculas son complementarias si pueden hibridarse con otra con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan hibridadas con otra bajo al menos condiciones de “alta rigurosidad” convencionales. Condiciones de rigurosidad convencional se describen por Sambrook y col., y por Haymes, y col. en: *Nucleic Acids Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985).

Por tanto, son permisibles desviaciones de complementariedad completa, en tanto que tales desviaciones no excluyan completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Así, con el fin de que una molécula de ácido nucleico o un fragmento de la molécula de ácido nucleico sirva de cebador o sonda, solo necesita ser suficientemente complementaria en secuencia para ser capaz de formar una estructura bicatenaria estable bajo el disolvente particular y las concentraciones de sales empleadas.

Condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN son, por ejemplo, 6,0 x cloruro sódico/citrato de sodio (SSC) a 45 °C, seguido de un lavado de 2,0 x SSC a 50 °C, son conocidas para aquellos expertos en la materia o pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sales en la etapa de lavado puede seleccionarse de una baja rigurosidad de 2,0 x SSC a 50 °C a una alta rigurosidad de 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, 22 °C, a condiciones de alta rigurosidad a 65 °C. Tanto temperatura como sal pueden variarse, o tanto la temperatura como la concentración de sales pueden mantenerse constantes mientras que se cambia la otra variable.

Un ácido nucleico para su uso en la presente invención puede hibridarse específicamente con una o más de las moléculas de ácidos nucleicos de WCR o complementos de las mismas bajo condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo, a 2,0 x SSC y 65 °C. Un ácido nucleico para su uso en la presente invención incluirá aquellas moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan específicamente con una o más de las moléculas de ácidos nucleicos desveladas en el presente documento como se exponen en, en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias o complementos de las mismas bajo condiciones de alta rigurosidad. Preferentemente, un ácido nucleico para su uso en la presente invención presentará al menos el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 98% o incluso el 100% de identidad de secuencias con una o más moléculas de ácidos nucleicos como se exponen en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias, o como se desvelan en el presente documento; o un ácido nucleico para su uso en la presente invención presentará el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 98% o incluso el 100% de identidad de secuencias con una o más moléculas de ácidos nucleicos como se exponen en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias aisladas a partir del ADN genómico de una plaga de insectos.

Toda o una porción sustancial de los ácidos nucleicos de WCR pueden usarse para aislar ADNc, ADNg y ácidos nucleicos que codifican homólogos de proteína de *Drosophila* o fragmentos de la misma de la misma u otras especies. Las descripciones detalladas de las técnicas de aislamiento e identificación de ácidos nucleicos de la presente invención de bibliotecas de ADNc o ADNg se desvelan en los ejemplos.

Los ácidos nucleicos de la presente invención también pueden sintetizarse, tanto completamente como en parte, especialmente si se desea proporcionar secuencias preferidas de planta, mediante procedimientos conocidos en la técnica. Así, toda o una parte de los ácidos nucleicos de la presente invención pueden sintetizarse usando codones preferidos por un huésped seleccionado. Codones preferidos por especie pueden determinarse, por ejemplo, a partir de los codones más frecuentemente usados en las proteínas expresadas en una especie huésped particular. Otras modificaciones de las secuencias de nucleótidos pueden producir mutantes que tienen actividad ligeramente alterada.

La presente invención proporciona en parte un sistema de administración para la administración de agentes de control de insectos a insectos. Las moléculas de ARNb o de ARNip estabilizado de la presente invención pueden introducirse directamente en las células de un insecto, o introducirse en una cavidad extracelular, espacio intersticial, sistema linfático, aparato digestivo, en la circulación del insecto mediante ingestión oral u otros medios que un experto en la materia pueda emplear. Los procedimientos para introducción oral pueden incluir mezcla directa de ARN con alimento del insecto, además de enfoques de ingeniería en los que una especie que se usa como alimento se manipula para expresar el ARNb o ARNip, luego se alimenta al insecto que va a afectarse. En una realización, por ejemplo, las moléculas de ARNb o ARNip pueden incorporarse en, o recubrirse sobre la parte superior de, la dieta del insecto. En otra realización, el ARN puede pulverizarse sobre una superficie de la planta. En todavía otra realización, el ARNb o ARNip puede expresarse por microorganismos y los microorganismos pueden aplicarse sobre una superficie de la planta o introducirse en una raíz, tallo por un medio físico tal como una inyección. En todavía otra realización, una planta puede manipularse genéticamente para expresar el ARNb o ARNip en una cantidad suficiente para destruir los insectos que se sabe que infectan la planta.

Específicamente, en la práctica de la presente invención en WCR, el ARNb o ARNip estabilizado puede introducirse en el intestino medio dentro del insecto y conseguir la inhibición deseada de los genes elegidos como diana. Las moléculas de ARNb o de ARNip pueden incorporarse en una dieta o recubrirse sobre la dieta como se trata anteriormente y pueden ingerirse por los insectos. En cualquier caso, el ARNb de la presente invención se proporciona en la dieta de la plaga diana. La plaga diana de la presente invención presentará un pH del tubo digestivo de 4,5 a 9,5, o de 5 a 8,5, o de 6 a 8, o de 6,5 a 7,7, o 7,0. El tubo digestivo de una plaga diana se define en el presente documento como la localización dentro de la plaga en la que el alimento que es ingerido por la plaga diana se expone a un entorno que es favorable para la captación de las moléculas de ARNb de la presente invención sin sufrir un pH tan extremo que provoque que el enlace de hidrógeno entre las hebras dobles del ARNb se disocie y forme moléculas monocatenarias.

Además, con el fin de controlar infestaciones de insectos en plantas, la administración de ARNb de control de insectos a las superficies de una planta mediante una aplicación por pulverización proporciona otros medios de proteger las plantas. En este caso, una bacteria manipulada para producir y acumular ARNb puede fermentarse y formularse los productos de la fermentación como un producto de pulverización compatible con prácticas agrícolas comunes. Las formulaciones pueden incluir los adhesivos y humectantes apropiados requeridos para cobertura foliar eficaz, además de protectores de UV para proteger el ARNb de daño por UV. Tales aditivos se usan comúnmente en la industria de los bioinsecticidas y son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Asimismo, las formulaciones para aplicación a la tierra pueden incluir formulaciones granulares que sirven de cebo para larvas de plagas de insectos de la tierra tales como el gusano de la raíz del maíz.

También se anticipa que los ARNb producidos por síntesis química o enzimática pueden formularse de un modo de acuerdo con prácticas agrícolas comunes y usarse como productos de pulverización para controlar infestaciones de insectos. Las formulaciones pueden incluir los adhesivos y humectantes apropiados requeridos para cobertura foliar eficaz, además de protectores de UV para proteger el ARNb de daño por UV. Tales aditivos se usan comúnmente en la industria de los bioinsecticidas y son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Tales aplicaciones podrían combinarse con otras aplicaciones de insecticidas de pulverización, biológicamente basadas o no, para potenciar la fitoprotección del daño por alimentación de insectos.

Los presentes inventores contemplan que cepas bacterianas que producen proteínas insecticidas pueden usarse para producir ARNb para fines de control de insectos. Estas cepas pueden presentar propiedades de control de insectos mejoradas. Puede usarse una variedad de diferentes huéspedes bacterianos para producir ARNb de control de insectos. Bacterias a modo de ejemplo pueden incluir *E. coli*, *B. thuringiensis*, *Pseudomonas* sp., *Photobacterium* sp., *Xenorhabdus* sp., *Serratia entomophila* y *Serratia* sp. relacionadas, *B. sphaericus*, *B. cereus*, *B. laterosporus*, *B. popilliae*, *Clostridium bifementans* y otras especies de *Clostridium*, u otras bacterias Gram-positivas formadoras de esporas.

La presente invención también se refiere a construcciones de ADN recombinante para la expresión en un microorganismo. Ácidos nucleicos exógenos de los que se transcribe un ARN de interés pueden introducirse en una célula microbiana huésped, tal como una célula bacteriana o una célula fúngica, usando procedimientos conocidos en la técnica.

Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden introducirse en una amplia variedad de huéspedes de microorganismos procariontes y eucariotes para producir las moléculas de ARNb o de ARNip estabilizado. El término "microorganismo" incluye especies microbianas procariontes y eucariotes tales como bacterias y hongos. Hongos incluyen levaduras y hongos filamentosos, entre otros. Procariontes ilustrativos, tanto Gram-negativos como Gram-positivos, incluyen *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella* y *Proteus*; *Bacillaceae*; *Rhizobiceae* tales como *Rhizobium*; *Spirillaceae* tales como *Photobacterium*, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; *Lactobacillaceae*; *Pseudomonadaceae* tales como *Pseudomonas* y *Acetobacter*; *Azotobacteraceae*, *Actinomycetales* y *Nitrospiraceae*. Entre eucariotes están hongos, tales como *Phycomycetes* y *Ascomycetes*, que incluye levadura, tales como *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*; y levadura de *Basidiomycetes*, tal como *Rhodotorula*, *Aureobasidium* y *Sporobolomyces*.

Con el fin de fitoprotección contra insectos, un gran número de microorganismos conocidos por habitar en el filopiano (la superficie de las hojas de la planta) y/o la rizoosfera (la tierra que rodea las raíces de la planta) de una amplia variedad de cultivos importantes también pueden ser células huésped deseables para manipulación, propagación, almacenamiento, administración y/o mutagénesis de las construcciones recombinantes desveladas. Estos microorganismos incluyen bacterias, algas y hongos. De particular interés son microorganismos tales como bacterias, por ejemplo, los géneros *Bacillus* (que incluyen las especies y subespecies *B. thuringiensis kurstaki HD-1*, *B. thuringiensis kurstaki HD-73*, *B. thuringiensis sotto*, *B. thuringiensis berliner*, *B. thuringiensis thuringiensis*, *B. thuringiensis tolworthi*, *B. thuringiensis dendrolimus*, *B. thuringiensis alesti*, *B. thuringiensis galleriae*, *B. thuringiensis aizawai*, *B. thuringiensis subtoxicus*, *B. thuringiensis entomocidus*, *B. thuringiensis tenebrionis* y *B. thuringiensis san diego*); *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Zanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* y *Alcaligenes*; hongos, particularmente levadura, por ejemplo, los géneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* y *Aureobasidium*. Son de particular interés aquellas especies bacterianas de fitosferas tales como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes eutrophus* y *Azotobacter vinlandii*; y especies de levadura de fitosferas tales como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae* y *Aureobasidium pollulans*.

Un vector de ADN recombinante bacteriano puede ser un plásmido lineal o circular cerrado. El sistema de vector puede ser un vector individual o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que va a introducirse en el genoma del huésped bacteriano. Además, el vector bacteriano puede ser un vector de expresión. Moléculas de ácidos nucleicos como se exponen en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias o fragmentos de las mismas pueden, por ejemplo, insertarse adecuadamente en un vector bajo el control de un promotor adecuado que funciona en uno o más huéspedes microbianos para accionar la expresión de una secuencia codificante ligada u otra secuencia de ADN. Muchos vectores están disponibles para este fin, y la selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño del ácido nucleico que va a insertarse en el vector y la célula huésped particular que va a transformarse con el vector. Cada vector contiene diversos componentes dependiendo de su función (amplificación de ADN o expresión de ADN) y la célula huésped particular con la que es compatible. Los componentes de vector para transformación bacteriana generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes del marcador de selección y un promotor inducible que permite la expresión de ADN exógeno.

Los vectores de expresión y de clonación generalmente contienen un gen de selección, también denominado un marcador de selección. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metrotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para bacilos. Aquellas células que se transforman satisfactoriamente con una proteína heteróloga o fragmento de la misma producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y así sobreviven la pauta de selección.

Un vector de expresión para producir un ARNm también puede contener un promotor inducible que es reconocido por el organismo huésped bacteriano y está operativamente ligado al ácido nucleico que codifica, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico que codifica el ARNm de *D. v. virgifera* o fragmento del mismo de interés. Promotores inducibles adecuados para su uso con huéspedes bacterianos incluyen promotor de  $\beta$ -lactamasa, promotores  $P_L$  y  $P_R$  del fago  $\lambda$  de *E. coli* y promotor de galactosa de *E. coli*, promotor de arabinosa, promotor de fosfatasa alcalina, promotor de triptófano (*trp*), y el promotor del operón de lactosa y variaciones de los mismos y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores inducibles bacterianos conocidos.

El término "operativamente ligada", como se usa en referencia a una secuencia reguladora y una secuencia de nucleótidos estructural, significa que la secuencia reguladora produce expresión regulada de la secuencia de nucleótidos estructural ligada. "Secuencias reguladoras" o "elementos de control" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas en la dirección 5' (secuencias no codificantes de 5'), dentro de, o en la dirección 3' (secuencias no traducidas de 3') de una secuencia de nucleótidos estructural, y que influyen en el momento correcto y nivel o cantidad de transcripción, procesamiento o estabilidad de ARN, o traducción de la secuencia de nucleótidos estructural asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias conductoras de la traducción, intrones, potenciadores, estructuras de tallo-lazo, secuencias de unión a represor y secuencias de reconocimiento de la poliadenilación.

Alternativamente, las construcciones de expresión pueden integrarse en el genoma bacteriano con un vector integrante. Los vectores integrantes contienen normalmente al menos una secuencia homóloga al cromosoma bacteriano que permite que se integre el vector. Las integraciones parecen resultar de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma bacteriano. Por ejemplo, los vectores integrantes contruidos con ADN de diversas cepas de *Bacillus* se

integran en el cromosoma de *Bacillus* (documento EP 0 127.328). Los vectores integrantes también pueden comprender secuencias de bacteriófago o de transposón. En la técnica también se conocen vectores suicidas.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes anteriormente enumerados emplea técnicas de ADN recombinante convencionales. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se escinden, se confeccionan y se religan en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos. Ejemplos de vectores de expresión bacterianos disponibles incluyen, pero no se limitan a, los vectores de clonación y expresión multifuncionales de *E. coli* tales como Bluescript™ (Stratagene, La Jolla, CA) en los que, por ejemplo, una proteína de *D. v. virgífera* o fragmento de la misma puede ligarse en el vector en marco con secuencias para la Met del extremo amino y los 7 residuos posteriores de β-galactosidasa de manera que se produzca una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264:5503-5509).

Una construcción recombinante de levadura puede normalmente incluir uno o más de los siguientes: una secuencia de promotor, secuencia de componentes de fusión, secuencia conductora, secuencia de terminación de la transcripción, un marcador de selección. Estos elementos pueden combinarse en un casete de expresión, que puede mantenerse en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) que pueden mantenerse establemente en un huésped, tal como levadura o bacterias. El replicón puede tener dos sistemas de replicación, permitiendo así que se mantenga, por ejemplo, en levadura para la expresión y en un huésped procariota para la clonación y amplificación. Ejemplos de tales vectores lanzadera de bacterias para levadura incluyen YEp24 (Botstein y col., 1979, Gene, 8:17-24), pCI/1 (Brake y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 81:4642-4646) y YRp17 (Stinchcomb y col., 1982, J. Mol. Biol., 158:157). Además, un replicón puede ser un plásmido tanto de alto como de bajo número de copias. Un plásmido de alto número de copias tendrá generalmente un número de copias que oscila de 5 a 200, y normalmente de 10 a 150. Un huésped que contiene un plásmido de alto número de copias tendrá preferentemente al menos 10, y más preferentemente al menos 20.

Secuencias de promotores de levadura útiles pueden derivarse de genes que codifican enzimas en la ruta metabólica. Ejemplos de tales genes incluyen alcohol deshidrogenasa (ADH) (documento EP 0 284044), enolasa, glucocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAP o GAPDH), hexocinasa, fosfofructocinasa, 3-fosfoglicerato mutasa y piruvato cinasa (PyK) (documento EP 0 3215447). El gen *PHO5* de la levadura, que codifica fosfatasa ácida, también proporciona secuencias de promotores útiles (Myanohara y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:1, 1983). Además, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también funcionan de promotores de levadura. Ejemplos de tales promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora de ADH ligada a la región de activación de la transcripción de GAP (patentes de EE.UU. nº 4.876.197 y 4.880.734). Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que consisten en las secuencias reguladoras de los genes *ADH2*, *GAL4*, *GAL10* o *PHO5*, combinados con la región de activación de la transcripción de un gen de enzima glicolítica tal como GAP o PyK (documento EP 0 164556). Además, un promotor de levadura puede incluir promotores que se producen naturalmente de origen de no levadura que tienen la capacidad de unirse a ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción.

Ejemplos de secuencias terminadoras de la transcripción y otras secuencias de terminación reconocidas por levadura, tales como aquellas que codifican enzimas glicolíticas, son conocidos para aquellos expertos en la materia.

Alternativamente, las construcciones de expresión pueden integrarse en el genoma de levadura con un vector integrante. Los vectores integrantes normalmente contienen al menos una secuencia homóloga a un cromosoma de levadura que permite que el vector se integre, y preferentemente contienen dos secuencias homólogas que flanquean la construcción de expresión. Las integraciones parecen resultar de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma de levadura (Orr-Weaver y col., 1983, Methods in Enzymol., 101:228-245). Un vector integrante puede dirigirse a un sitio específico en levadura seleccionando la secuencia homóloga apropiada para la inclusión en el vector. Véase Orr-Weaver y col., arriba. Una o más construcciones de expresión pueden integrarse, afectando posiblemente los niveles de proteína recombinante producida (Rine y col., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:6750). Las secuencias cromosómicas incluidas en el vector pueden producirse tanto como un único segmento en el vector, que produce la integración del vector entero, como dos segmentos homólogos a segmentos adyacentes en el cromosoma y que flanquean la construcción de expresión en el vector, que produce la integración estable de solo la construcción de expresión.

La presente invención también contempla la transformación de una secuencia de nucleótidos de la presente invención en una planta para lograr niveles de expresión inhibidores de plagas de una o más moléculas de ARNb. Un vector de transformación puede prepararse fácilmente usando procedimientos disponibles en la materia. El vector de transformación comprende una o más secuencias de nucleótidos que puede/pueden transcribirse con una molécula de ARN y que es/son sustancialmente homóloga/s y/o complementaria/s a una o más secuencias de nucleótidos codificadas por el genoma del insecto, de forma que tras la captación del ARN transcrito de la una o más moléculas de secuencias de nucleótidos por el insecto haya regulación por disminución de la expresión de al menos una de las secuencias de nucleótidos respectivas del genoma del insecto.

El vector de transformación puede significar adicionalmente una construcción de ADNb y también puede considerarse,

entre otras cosas, una molécula recombinante, un agente de control de insectos, una molécula genética o una construcción genética quimérica. Una construcción genética quimérica de la presente invención puede comprender, por ejemplo, secuencias de nucleótidos que codifican uno o más transcritos antisentido, uno o más transcritos sentido, uno o más de cada uno de los anteriormente mencionados, en los que todo o parte de un transcrito de la misma es homólogo a toda o parte de una molécula de ARN que comprende una secuencia de ARN codificada por una secuencia de nucleótidos dentro del genoma de un insecto.

En una realización, el vector de transformación de planta es una molécula de ADN aislada y purificada que comprende un promotor operativamente ligado a una o más secuencias de nucleótidos de la presente invención. La secuencia de nucleótidos está seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 y SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias. La secuencia de nucleótidos incluye un segmento que codifica todo o parte de un ARN presente dentro de un transcrito de ARN de plaga elegido como diana y puede comprender repeticiones invertidas de toda o una parte de un ARN de plaga elegido como diana. La molécula de ADN que comprende el vector de expresión también puede contener una secuencia de intrón funcional posicionada tanto en la dirección 5' de la secuencia codificante como incluso dentro de la secuencia codificante, y también puede contener una secuencia conductora sin traducir de cinco prima (5') (es decir, una UTR o 5'-UTR) posicionada entre el promotor y el punto de iniciación de la traducción.

Un vector de transformación de planta puede contener secuencias de más de un gen, permitiendo así la producción de más de un ARN para inhibir la expresión de dos o más genes en células de una plaga diana. Un experto en la materia apreciará fácilmente que segmentos de ADN cuya secuencia se corresponde con la presente en diferentes genes pueden combinarse en un único segmento de ADN compuesto para la expresión en una planta transgénica. Alternativamente, un plásmido de la presente invención que ya contiene al menos un segmento de ADN puede modificarse por la inserción secuencial de segmentos de ADN adicionales entre las secuencias de potenciador y promotor y terminador. En el agente de control de insectos de la presente invención diseñado para la inhibición de múltiples genes, los genes que van a inhibirse pueden obtenerse de la misma especie de insectos con el fin de potenciar la eficacia del agente de control de insectos. En ciertas realizaciones, los genes pueden derivarse de diferentes insectos con el fin de ensanchar el intervalo de insectos contra los que el agente es eficaz. Si se eligen múltiples genes como diana para la supresión o una combinación de expresión y supresión, puede fabricarse un elemento de ADN policistrónico como se ilustra y desvela en Fillatti, publicación de solicitud n° US 2004-0029283.

Si una secuencia de nucleótidos de la presente invención va a usarse para transformar una planta, se selecciona un promotor que presenta la capacidad de accionar la expresión de la secuencia codificante en esa especie de planta particular. Promotores que funcionan en diferentes especies de plantas también son muy conocidos en la técnica. Promotores útiles para la expresión de polipéptidos en plantas son aquellos que son inducibles, virales, sintéticos o constitutivos como se describen en Odell y col. (1985, *Nature* 313:810-812), y/o promotores que son temporalmente regulados, espacialmente regulados y espaciotemporalmente regulados. Promotores preferidos incluyen los promotores de CaMV35S potenciados, y el promotor de FMV35S. Con el fin de la presente invención, por ejemplo, para el control óptimo de especies que se alimentan de raíces, es preferible alcanzar los mayores niveles de expresión de estos genes dentro de las raíces de plantas. Se han identificado varios promotores potenciados de raíz y se conocen en la técnica. (Lu y col., 2000, *J. Plant Phys.*, 156(2):277-283; patente de EE.UU. n° 5.837.848 y 6.489.542). Un vector o construcción de ADN recombinante de la presente invención comprenderá normalmente un marcador de selección que confiere un fenotipo de selección a células de planta. Los marcadores de selección también pueden usarse para seleccionar plantas o células de planta que contienen los ácidos nucleicos exógenos que codifican polipéptidos o proteínas de la presente invención. El marcador puede codificar resistencia a biocidas, resistencia a antibióticos (por ejemplo, kanamicina, bleomicina G418, higromicina) o resistencia a herbicidas (por ejemplo, glifosato). Ejemplos de marcadores de selección incluyen, pero no se limitan a, un gen *neo* que codifica resistencia a kanamicina y puede seleccionarse para usar kanamicina, G418; un gen *bar* que codifica resistencia a bialafos; un gen EPSP sintasa mutante que codifica resistencia a glifosato; un gen nitrilasa que confiere resistencia a bromoxinilo; un gen acetolactato sintasa (ALS) mutante que confiere resistencia a imidazolinona o sulfonilurea; y un gen DHFR de resistencia a metotrexato.

Un vector recombinante o construcción de la presente invención también puede incluir un marcador de selección. Los marcadores de selección pueden usarse para monitorizar la expresión. Marcadores de selección a modo de ejemplo incluyen a un gen  $\beta$ -glucuronidasa o *uidA* (GUS) que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos (Jefferson, 1987, *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405; Jefferson y col., 1987, *EMBO J.* 6:3901-3907); un gen de sitio R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos de planta (Dellaporta y col., 1988, *Stadler Symposium* 11:263-282); un gen  $\beta$ -lactamasa (Sutcliffe y col., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:3737-3741), un gen que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen luciferasa (Ow y col., 1986, *Science* 234:856-859), un gen xylE (Zukowsky y col., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:1101-1105) que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir catecoles cromogénicos; un gen  $\alpha$ -amilasa (Ikata y col., 1990, *Bio/Technol.* 8:241-242); un gen tirosinasa (Katz y col., 1983, *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-2714) que codifica una enzima que puede oxidar tirosina a DOPA y dopaquinona que a

su vez condensa a melanina; una  $\alpha$ -galactosidasa, que cataliza un sustrato de  $\alpha$ -galactosa cromogénico.

En general se prefiere introducir un ADN recombinante funcional en una localización no específica en un genoma de planta. En casos especiales puede ser útil insertar una construcción de ADN recombinante por integración específica para sitio. Existen varios sistemas de recombinación específicos para sitio que son conocidos por implantes funcionales, que incluyen cre-lox como se desvela en la patente de EE.UU. 4.959.317 y FLP-FRT como se desvela en la patente de EE.UU. 5.527.695.

En la práctica, se introduce ADN en solo un pequeño porcentaje de células diana en cualquier experimento de transformación individual. Los genes que codifican marcadores de selección se usan para proporcionar un sistema eficaz para la identificación de aquellas células que se transforman establemente recibiendo e integrando una construcción de ADN transgénico en sus genomas. Genes marcadores preferidos proporcionan marcadores selectivos que confieren resistencia a un agente selectivo, tal como un antibiótico o herbicida. Cualquiera de los herbicidas a los que las plantas de la presente invención pueden ser resistentes son agentes útiles para marcadores selectivos. Células posiblemente transformadas se exponen al agente selectivo. En la población de células supervivientes estarán aquellas células en las que, generalmente, el gen que confiere resistencia se ha integrado y expresado a niveles suficientes para permitir la supervivencia celular. Las células pueden probarse adicionalmente para confirmar integración estable del ADN exógeno. Genes de marcadores selectivos comúnmente usados incluyen aquellos que confieren resistencia a antibióticos tales como kanamicina (*nptII*), higromicina B (*aph IV*) y gentamicina (*aac3* y *aacC4*) o resistencia/tolerancia a herbicidas tales como glufosinato (*bar* o *pat*), glifosato (EPSPS) y AMPA (*phnO*). Ejemplos de tales marcadores de selección se ilustran en las patentes de EE.UU. 5.550.318; 5.633.435; 5.780.708 y 6.118.047. Los marcadores de selección que proporcionan una capacidad para identificar visualmente transformantes también pueden emplear, por ejemplo, un gen que expresa una proteína coloreada o fluorescente tal como una luciferasa o proteína verde fluorescente (GFP) o un gen que expresa un gen *beta*-glucuronidasa o *uidA* (GUS) para el que se conocen diversos sustratos cromogénicos. Vectores de transformación en plantas preferidos incluyen aquellos derivados de un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.536.475, 4.693.977, 4.886.937, 5.501.967 y el documento EP 0 122 791). Los plásmidos de *Agrobacterium rhizogenes* (o "Ri") también son útiles y conocidos en la técnica. Otros vectores de transformación en plantas preferidos incluyen los desvelados, por ejemplo, por Herrera-Estrella (1983, Nature 303:209-213), Bevan (1983, Nature 304:184-187), Klee (1985, Bio/Technol. 3:637-642) y el documento EP 0 120 516.

Los procedimientos y composiciones para transformar plantas introduciendo una construcción de ADN recombinante en un genoma de planta incluyen distintos procedimientos conocidos en la técnica. Un procedimiento para construir plantas transformadas es bombardeo con microproyectiles como se ilustra en las patentes de EE.UU. 5.015.580, 5.550.318, 5.538.880, 6.153.812, 6.160.208, 6.288.312 y 6.399.861. Otro procedimiento para construir plantas transformadas es transformación mediada por *Agrobacterium* como se ilustra en las patentes de EE.UU. 5.159.135, 5.824.877, 5.591.616 y 6.384.301. Alternativamente, pueden usarse otras especies de no *Agrobacterium* tales como, por ejemplo, *Rhizobium* y otras células procariotas que presentan la capacidad de infección de células de planta e introducción de secuencias de nucleótidos heterólogas en el (los) genoma(s) de la célula de planta infectada.

Las construcciones de ADN de la presente invención pueden introducirse en el genoma de un huésped de planta deseado mediante una variedad de técnicas de transformación convencionales, que son muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Vectores de transformación en plantas adecuados con el fin de transformación mediada por *Agrobacterium* incluyen aquellos derivados de un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Además de vectores de transformación en plantas mediados por *Agrobacterium*, pueden usarse procedimientos alternativos para insertar las construcciones de ADN de la presente invención en células de planta. Tales procedimientos pueden implicar, pero no se limitan a, por ejemplo, el uso de liposomas, electroporación, productos químicos que aumentan la captación de ADN libre, administración de ADN libre mediante bombardeo con microproyectiles y transformación usando virus o polen. Cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención puede introducirse en una célula de planta de una manera permanente o transitoria en combinación con otros elementos genéticos tales como promotores, intrones, potenciadores y secuencias conductoras sin traducir. Cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican un ARN de especies de coleópteros o un ARN de una especie de insectos perforadores y succionadores, o preferentemente un ARN de *D. v. virgifera* o un ARN de *Lygus hesperus*, puede fabricarse e introducirse en una célula de planta de un modo que permita la producción de las moléculas de ARNb dentro de la célula de planta, proporcionando una cantidad insecticida de uno o más ARNb particulares en la dieta de una plaga de insectos diana. El término "célula de planta transgénica" o "planta transgénica" se refiere a una célula de planta o una planta que contiene un ácido nucleico exógeno, que puede derivarse de WCR, o de una especie de insectos diferente o cualquier otra especie de no insecto. Las plantas transgénicas también pretenden comprender progenie (descendiente, cría) de cualquier generación de una planta transgénica tal o una semilla de cualquier generación de todas aquellas plantas transgénicas en las que dicha progenie o semilla comprenda una secuencia de ADN que codifica el ARN, ARNp, ARNb, ARNip, o fragmento de los mismos de la presente invención también es un aspecto importante de la invención.

Una planta transgénica formada usando procedimientos de transformación con *Agrobacterium* normalmente contiene una simple secuencia de ADN recombinante individual insertada en un cromosoma y se denomina un evento transgénico.

Puede denominarse que tales plantas transgénicas son heterocigóticas para la secuencia exógena insertada. Una planta transgénica homocigótica con respecto a un transgén puede obtenerse apareando sexualmente (autofecundando) una planta transgénica segregante independiente que contiene una única secuencia de genes exógena consigo misma, por ejemplo, una planta F0, para producir semilla F1. Un cuarto de la semilla F1 producida será heterocigótica con respecto al transgén. La germinación de la semilla F1 produce plantas que pueden probarse para heterocigosidad, normalmente usando un ensayo de SNP o un ensayo de amplificación térmica que permite la distinción entre heterocigotos y homocigotos (es decir, un ensayo de cigosidad). El cruce de una planta heterocigótica consigo misma u otra planta heterocigótica solo produce progenie heterocigótica.

Además de la transformación directa de una planta con una construcción de ADN recombinante, las plantas transgénicas pueden prepararse cruzando una primera planta que tiene una construcción de ADN recombinante con una segunda planta que carece de la construcción. Por ejemplo, el ADN recombinante para supresión génica puede introducirse en la primera línea de planta que es aceptada para transformación para producir una planta transgénica que puede cruzarse con una segunda línea de planta para introgresar el ADN recombinante para supresión génica en la segunda línea de planta.

Plantas transgénicas que pueden generarse por la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, alfalfa, eneldo, manzana, albaricoque, alcachofa, rúcula, espárrago, aguacate, banana, cebada, judías, remolacha, zarzamora, arándano, brócoli, coles de Bruselas, col, canola, melón cantalupo, zanahoria, mandioca, coliflor, apio, cereza, cilantro, cítrico, clementina, café, maíz, algodón, pepino, abeto de Douglas, berenjena, endivia, escarola, eucalipto, hinojo, higos, calabacino, uva, pomelo, rocío de miel, jícama, kiwi, lechuga, puerro, limón, lima, pino de Loblolly, mango, melón, seta, nuez, avena, oca, cebolla, naranja, una planta ornamental, papaya, perejil, guisante, melocotón, cacahuete, pera, pimienta, persimón, pino, piña, plátano, ciruela, granada, álamo, patata, calabaza, membrillo, *Pinus radiata*, achicoria roja, rábano, frambuesa, arroz, centeno, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, calabacín amarillo, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, batata, liquidámbar, tangerina, té, tabaco, tomate, césped, una vid, sandía, trigo, boniatos y calabacín verde.

La presente invención puede combinarse, en la práctica, con otros rasgos de control de insectos en una planta para lograr rasgos deseados para el control potenciado de infestación de insectos. El combinar los rasgos de control de insectos que emplean distintos modos de acción puede proporcionar plantas transgénicas protegidas de insectos con superior durabilidad con respecto a plantas que alojan un único rasgo de control de insectos debido a la reducida probabilidad de que la resistencia se desarrolle en el campo.

El mecanismo de actividad insecticida de proteínas cristalinas de *B. thuringiensis* se ha estudiado extensivamente en la década anterior. Se ha mostrado que las proteínas cristalinas son tóxicas para la forma de larva del insecto solo después de la ingestión de la proteína. En larvas de lepidóptero, un pH alcalino y enzimas proteolíticas en el intestino medio del insecto solubilizan las proteínas, permitiendo así la liberación de componentes que son tóxicos para el insecto. Estos componentes tóxicos rompen las células del intestino medio, hacen que el insecto deje de comer y, eventualmente, provocan la muerte del insecto. Por este motivo, las toxinas de *B. thuringiensis* han demostrado que son por sí mismas insecticidas eficaces y medioambientalmente seguras a la hora de tratar diversas plagas de insectos. Los insectos coleópteros y hemipteros, y probablemente dípteros, lygus y otros insectos perforadores y succionadores, presentan un pH del intestino que es ligeramente ácido, y así las toxinas de Bt que son eficaces contra larvas de lepidópteros son ineficaces contra estas plagas. El pH ligeramente ácido del intestino de estos insectos también se cree que es más hospitalario que las composiciones de la presente invención, y sin pretender limitarse a una teoría particular, es probable que el pH alcalino del intestino de larvas de lepidóptero sea el motivo de que hayan fracasado intentos anteriores de presentar eficacia de ARNb (Fire y col., patente de EE.UU. nº 6.506.559; Mesa y col., publicación de patente EE.UU. nº US2003/0150017; Rajagopal y col., 2002, J. Biol. Chem. 277:46849-46851; Tabara y col., 1998, Science 282:430-431). Por tanto, se cree que los procedimientos de ARNb desvelados en el presente documento deben usarse preferencialmente en composiciones y en plantas para controlar coleópteros, dípteros, hemípteros, lygus e insectos perforadores y succionadores. Los procedimientos y composiciones expuestos en el presente documento son particularmente útiles para elegir como diana genes para la supresión en insectos que presentan un pH del intestino de 4,5 a 9,5, o de 5,0 a 9,0, o de 5,5 a 8,5, o de 6,0 a 8,0, o de 6,5 a 7,7, o de 6,8 a 7,6, o 7,0. Sin embargo, insectos y otras especies de plagas que presentan un pH del intestino de 7,5 a 11,5, o de 8,0 a 11,0, o de 9,0 a 10,0, tales como larvas de insectos lepidópteros, también pretenden estar dentro del ámbito de la presente invención. Esto es particularmente cierto cuando un ARNb específico para inhibir un gen en una larva de lepidóptero se proporciona en la dieta de la larva junto con una o más proteínas de Bt, que, con respecto a la proteína de Bt, generalmente sería tóxico para aquellas larvas de lepidóptero cuando se proporcionan a o por encima de un nivel umbral. La presencia de una o más toxinas de Bt tóxicas para la misma especie de insectos reduciría eficazmente el pH del intestino, proporcionando un entorno estable para que las moléculas de ARN bicatenario ejercieran sus efectos de suprimir un gen diana en la plaga de insectos.

Sería útil combinar una o más construcciones de ARNb estabilizado que producen moléculas de ARNb de la presente invención en la dieta de una plaga de insectos diana junto con una o más proteínas insecticidas, de forma que el ARNb y la proteína insecticida fueran tóxicos para la misma plaga de insectos. La proteína insecticida podría derivarse de *B.*

*thuringiensis*, pero también de otros organismos conocidos en la técnica que producen proteínas insecticidas tales como simbiontes bacterianos de nematodos entomopatógenos (por ejemplo, *Photorhabdus* sp., *Xenorhabdus* sp.), *Serratia entomophila* y *Serratia* sp. relacionadas, *B. sphaericus*, *B. cereus*, *B. laterosporus*, *B. popilliae*, *Clostridium bifementans*, u otras bacterias Gram-positivas formadoras de esporas que presentan propiedades insecticidas. Asimismo, se imagina que dos o más construcciones de ARNb estabilizado diferentes que producen moléculas de ARNb de la presente invención podrían proporcionarse juntas dentro de una única planta para garantizar la durabilidad del fenotipo de control de insectos. Estas moléculas de ARNb podrían elegir como diana el mismo gen para silenciamiento o, alternativamente, diferentes genes diana para silenciamiento. Dos o más ARNb diferentes pueden combinarse juntos en la misma planta, siendo cada ARNb tóxico para una plaga de insectos diferente, no siendo ninguno de los ARNb tóxicos para la misma especie de insectos.

Se tiene previsto que la combinación de ciertas construcciones de ARNb estabilizado con uno o más genes de proteínas de control de insectos produzca sinergias que potencien el fenotipo de control de insectos de una planta transgénica. Pueden usarse bioensayos de insectos que emplean tejido con dieta artificial o de planta completa para definir respuestas a dosis para mortalidad de larva o inhibición del crecimiento usando tanto ARNb como proteínas de control de insectos. Un experto en la materia puede probar mezclas de moléculas de ARNb y proteínas de control de insectos en bioensayo para identificar combinaciones de activos que son sinérgicas y deseables para utilización en plantas protegidas de insectos (Tabashnik, 1992). La sinergia en destruir plagas de insectos se ha informado entre diferentes proteínas de control de insectos (para revisión véase Schnepf y col., 1998). Se tiene previsto que existan sinergias entre ciertos ARNb y entre ciertos ARNb y ciertas proteínas de control de insectos.

También se anticipa que las combinaciones de ARNb revelarán toxicidad inesperada hacia ciertas plagas de insectos. Rajagopol y col. (2002, J Biol Chem. 277:46849-46851) informaron que alimentar ARNb a larvas de la plaga de lepidópteros *S. litura* fue ineficaz en silenciar un gen que codificara una aminopeptidasa del intestino medio. Merece la pena indicar que el entorno de pH alcalino del intestino medio de lepidópteros típico puede ser un entorno hostil para el ARNb ya que cabría esperar que la desnaturalización del dúplex de ARN a pH alcalino condujera a degradación rápida. Los poros formados por proteínas de toxinas de *B. thuringiensis* insertadas en la membrana epitelial del intestino medio producen una neutralización del pH del intestino medio (revisado en Gill, 1995, Mem. Inst. Osaldo Cruz, Rio de Janeiro, 90:69-74). Por consiguiente, las proteínas de toxinas de *B. thuringiensis* que solo son capaces de formar canales de iones transitorios en la membrana epitelial del intestino medio de lepidópteros sin causar mortalidad pueden ser suficientes para reducir el pH del intestino medio a niveles más propicios para la captación de ARNb por células epiteliales del intestino medio. Como ejemplo, se sabe que la proteína CryIAc no es una toxina eficaz contra el gusano cogollero de la remolacha, *Spodoptera exigua* (Chambers y col., 1991, J. Bacteriol. 173:3966-3976). Sin embargo, reducciones transitorias en el pH del intestino medio producidas por la proteína CryIAc podrían servir para estabilizar ARNb co-ingeridos y hacerlos eficaces en silenciar genes diana de *S. exigua*, proporcionándose así un medio inesperado de control de esta plaga de insectos. Este efecto podría observarse con cualquier proteína, insecticida o no, que alterara la regulación iónica de células del intestino medio de insectos lepidópteros, y también puede ser eficaz en coleópteros, dípteros, hemípteros, chinches lygus y otras especies de insectos perforadores y succionadores.

Algunas proteínas insecticidas de *B. thuringiensis*, tales como las proteínas Cyt, pueden producir orificios transitorios en la membrana epitelial del intestino medio de larvas de insectos sensibles debido a la formación de poros estructurados o a la actividad similar a detergente general de la proteína (Butko, 2003, Appl. Environ. Microbiol. 69:2415-2422). Tales orificios podrían facilitar el paso de moléculas de ARNb a células epiteliales del intestino medio incluso a concentraciones de proteína que son inferiores a las óptimas para causar mortalidad. Se tiene previsto que cualquier proteína, insecticida o no, que produzca orificios transitorios en las membranas epiteliales de insectos puedan facilitar el paso de las moléculas de ARNb en células de insecto y promover el silenciamiento de genes.

Las secuencias de nucleótidos proporcionadas como se expone en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 o en SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174 como se exponen en el listado de secuencias o fragmentos de las mismas, o complementos de las mismas, pueden "proporcionarse" en una variedad de medios para facilitar el uso. Un medio tal también puede proporcionar un subconjunto de las mismas en una forma que permita que un experto examine las secuencias.

Los productos de materias primas que contienen una o más de las secuencias de la presente invención, y se producen a partir de una planta o semilla recombinante que contiene una o más de las secuencias de nucleótidos de la presente invención, se contemplan específicamente como realizaciones de la presente invención. Un producto de materia prima que contiene una o más de las secuencias de la presente invención está previsto que incluya, pero no se limita a, harinas, aceites, granos molidos o enteros o semillas de una planta, o cualquier producto alimenticio que comprenda cualquier harina, aceite o grano molido o entero de una planta o semilla recombinante que contiene una o más de las secuencias de la presente invención. La detección de una o más de las secuencias de la presente invención en una o más materias primas o los productos de materias primas contemplados en el presente documento es de hecho una prueba de que la materia prima o producto de materia prima está compuesto por una planta transgénica diseñada para expresar una o más de las secuencias de nucleótidos de la presente invención con el fin de controlar la infestación de insectos usando procedimientos de supresión génica mediada por ARNb.

En una aplicación de la presente realización, una secuencia de nucleótidos de la presente invención puede grabarse en medios legibles por ordenador. Como se usa en el presente documento, "medios legibles por ordenador" se refiere a cualquier medio tangible de expresión que pueda ser leído y al que se acceda directamente por un ordenador. Tales medios incluyen, pero no se limitan a: medios de almacenamiento magnético tales como discos flexibles, disco duro, medio de almacenamiento y cinta magnética; medios de almacenamiento óptico tales como CD-ROM; medios de almacenamiento eléctrico tales como RAM y ROM; archivos de ordenador formateados de reconocimiento de caracteres ópticos, e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnético/óptico. Un experto puede apreciar fácilmente que cualquiera de los medios legibles por ordenador presentemente conocidos puede usarse para crear un producto manufacturado que comprenda medio legible por ordenador que tiene grabado sobre el mismo una secuencia de nucleótidos de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, "grabado" se refiere a un procedimiento para guardar información sobre el medio legible por ordenador. Un experto puede adoptar fácilmente cualquiera de los procedimientos presentemente conocidos para grabar información sobre el medio legible por ordenador para generar medios que comprendan la información de secuencias de nucleótidos de la presente invención. Está disponible una variedad de estructuras de almacenamiento de datos para un experto para crear un medio legible por ordenador que tiene grabado sobre él mismo una secuencia de nucleótidos de la presente invención. La elección de la estructura de almacenamiento de datos se basará generalmente en los medios elegidos para acceder a la información guardada. Además, puede usarse una variedad de programas procesadores de datos y formatos para guardar la información de secuencias de nucleótidos de la presente invención en el medio legible por ordenador. La información de secuencias puede representarse en un archivo de texto de procesamiento de palabras, formateado en software comercialmente disponible tal como WordPerfect y Microsoft Word, o representado en forma de un archivo de texto en ASCII, guardado en una aplicación de base de datos, tal como DB2, Sybase u Oracle. El experto puede adaptar fácilmente cualquier número de formatos de estructuración de procesadores de datos (por ejemplo, archivo de texto o base de datos) con el fin de obtener el medio legible por ordenador que tiene grabado sobre él mismo la información de secuencias de nucleótidos de la presente invención.

Está públicamente disponible software informático que permite que un experto acceda a información de secuencias proporcionadas en un medio legible por ordenador. El software que implementa los algoritmos de búsqueda BLAST (Altschul y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)) y BLAZE (Brutlag, y col., Comp. Chem. 17: 203-207 (1993)) en un sistema Sybase puede usarse para identificar marcos de lectura abiertos (ORF) dentro de secuencias tales como Unigenes y EST que se proporcionan en el presente documento y que contienen homología con ORF o proteínas de otros organismos. Tales ORF son fragmentos que codifican proteínas dentro de las secuencias de la presente invención y son útiles en la producción de proteínas comercialmente importantes tales como enzimas usadas en la biosíntesis de aminoácidos, metabolismo, transcripción, traducción, procesamiento de ARN, degradación de ácidos nucleicos y proteínas, modificación de proteínas, y replicación, restricción, modificación, recombinación y reparación de ADN.

La presente invención proporciona además sistemas, particularmente sistemas basados en ordenador, que contienen la información de secuencias descrita en el presente documento. Tales sistemas se diseñan para identificar fragmentos comercialmente importantes de la molécula de ácido nucleico de la presente invención. Como se usa en el presente documento, "un sistema basado en ordenador" se refiere a los medios de hardware, medios de software y medios de almacenamiento de datos usados para analizar la información de secuencias de nucleótidos de la presente invención. Los medios de hardware mínimos de los sistemas basados en ordenador de la presente invención comprenden una unidad de procesamiento central (CPU), medios de entrada, medios de salida y medios de almacenamiento de datos. Un experto puede apreciar fácilmente que uno cualquiera de los sistemas basados en ordenador actualmente disponibles es adecuado para su uso en la presente invención.

La longitud de secuencia más preferida de una secuencia diana es de 10 a 100 aminoácidos o de 23 a 300 residuos de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, "un motivo estructural diana" o "motivo diana" se refiere a cualquier secuencia racionalmente seleccionada o combinación de secuencias en la que la secuencia o secuencias se eligen basándose en una configuración tridimensional que se forma tras el plegamiento del motivo diana. Hay una variedad de motivos diana conocidos en la técnica. Motivos de proteína diana incluyen, pero no se limitan a, sitios activos enzimáticos y secuencias señal. Motivos de ácido nucleico diana incluyen, pero no se limitan a, secuencias de promotores, elementos en cis, estructuras de horquilla y elementos de expresión inducibles (secuencias de unión a proteína).

### Ejemplos

Los inventores en el presente documento han identificado un medio para controlar la infestación de plagas de invertebrados proporcionando una molécula de ácido ribonucleico bicatenario en la dieta de la plaga. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que una molécula de ácido ribonucleico bicatenario funciona tras la digestión por la plaga inhibiendo una función biológica en la plaga, produciendo uno o más de los siguientes atributos: reducción en la alimentación por la plaga, reducción en la viabilidad de la plaga, muerte de la plaga, inhibición de la diferenciación y

desarrollo de la plaga, ausencia de o capacidad reducida de reproducción sexual por la plaga, formación de músculo, formación de hormona juvenil, regulación de la hormona juvenil, regulación y transporte de iones, mantenimiento del potencial de la membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación de esperma, síntesis de feromonas, sensibilización de feromonas, formación de antenas, formación de alas, formación de patas, desarrollo y diferenciación, formación de huevos, maduración de larvas, formación de enzimas digestivas, síntesis de hemolinfa, mantenimiento de hemolinfa, neurotransmisión, división celular, metabolismo energético, respiración, apoptosis, y cualquier componente de una estructura citoesquelética de células eucariotas tal como, por ejemplo, actinas y tubulinas. Uno cualquiera o cualquier combinación de estos atributos puede producir una inhibición eficaz de la infestación de plagas, y en el caso de una plaga de plantas, inhibición de la infestación de la planta. Por ejemplo, cuando se usa como composición de dieta que contiene una cantidad suficiente inhibidora de plagas de una o más moléculas de ácidos ribonucleicos bicatenarios proporcionadas tópicamente a una planta, como un tratamiento de semilla, como una aplicación de la tierra alrededor de una planta, o cuando se produce por una planta a partir de una molécula de ADN recombinante presente dentro de las células de una planta, la infestación de plagas de plantas se reduce inesperadamente espectacularmente. Los ejemplos expuestos en el presente documento más adelante son ilustrativos de la invención.

### Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la identificación de secuencias de nucleótidos que, cuando se proporcionan en forma de moléculas de ARN bicatenario en la dieta de un gusano de la raíz del maíz, son útiles para controlar gusanos de la raíz del maíz.

Las bibliotecas de ADNc de gusano de la raíz del maíz (LIB149, LIB 150, LIB3027, LIB3373) se construyeron a partir de larvas completas y de secciones del intestino medio diseccionadas, y se obtuvo la información de secuencias de nucleótidos (véase Andersen y col., solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 10/205.189 presentada el 24 de julio de 2002, incorporada en el presente documento específicamente por referencia en su totalidad). Además, se construyeron bibliotecas de ADNc a partir de larvas completas en diferentes estadios de desarrollo y en diferentes momentos dentro de cada estadio de desarrollo con el fin de maximizar el número de secuencias de EST diferentes de la especie de *Diabrotica*. Se construyeron las bibliotecas LIB5444 y LIB5462 respectivamente de conjuntos de ARNm obtenidos de larvas del gusano de la raíz del maíz occidental de primer (1 gramo) y tercer (2,9 gramos) estadio. Los insectos recogidos se congelaron rápidamente por inserción en nitrógeno líquido. Los insectos se molieron en un mortero y pistilo mantenido a o por debajo de -20 °C por enfriamiento sobre nieve carbónica y/o con la adición de nitrógeno líquido al mortero hasta que el tejido se molió en un polvo fino. El ARN se extrajo usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se aisló ARN de poli A+ de la preparación de ARN total usando Dynabeads Oligo dT (Dyna Inc., NY) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se construyó una biblioteca de ADNc a partir del ARN de poli A+ usando el sistema de plásmido SuperScript™ (Invitrogen). El ADNc se fraccionó de tamaño usando cromatografía. La cuarta y quinta fracciones se recogieron y se ligaron en el vector pSPORT1 (Life Technologies Inc., Gaithersburg MD) entre los sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción *Sa1* y *Not1*, y se transformaron en células electro-competentes de DH10B de *E. coli* por electroporación. La biblioteca de larvas del primer estadio dio 420.000 unidades formadoras de colonias. La biblioteca de larvas del tercer estadio dio  $2,78 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias. Las colonias de LIB149, LIB150 se lavaron de las placas, se mezclaron hasta uniformidad removiendo brevemente con vórtex y se reunieron en tampón Tris-EDTA. La mitad del lavado se llevó al 10% de glicerol, se tomaron alícuotas en crioviales y se guardaron a -70 °C. La otra mitad se usó para producir ADN de plásmido usando una columna de purificación Quiagen midi-prep, o su equivalente. El ADN de plásmido purificado se repartió en alícuotas en tubos Microfuge y se guardó a -20 °C.

Las colonias de las bibliotecas de ADNc de *Diabrotica virgifera* LIB5444 y LIB5462 se amplificaron individualmente en un medio de alta viscosidad. Aproximadamente 200.000 unidades formadoras de colonias de LIB5444 y 600.000 unidades formadoras de colonias de LIB5462 se mezclaron sobre una placa con agitación por separado en 500 ml de medio LB que contenía 0,3% de SeaPrep Agarose® y 50 mg/l de carbenicilina a 37 °C y luego se enfriaron rápidamente en un baño de agua/hielo durante 1 hora permitiendo la suspensión uniforme de las colonias bacterianas. Las bibliotecas inoculadas se cultivaron entonces a 30 °C durante 42 horas. Después de la incubación, las células se mezclaron durante 5 minutos sobre una placa con agitación. El medio se transfirió entonces a dos botellas de centrifuga de 250 ml. Las células bacterianas se sedimentaron a 10.000 x g durante 10 minutos. El medio se sacó de las botellas y las células se resuspendieron en un total de 20 ml de medio LB con 50 mg/l de carbenicilina. Se añadió sulfóxido de dimetilo al 10% para preservar las células en congelación. Ambas bibliotecas se amplificaron a un título final de  $10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro. Muestras de las bibliotecas de ADNc de *Diabrotica virgifera* LIB5444 y LIB5462 se combinaron y se ajustaron a una concentración de ADN de 1,25 microgramos por microlitro en agua destilada estéril y desionizada y se repartieron en alícuotas en veinticinco crioviales, conteniendo cada criovial 8,75 microgramos de ADN. Estas muestras se depositaron por el (los) solicitante(s)/inventores en la Colección americana de cultivos tipo (ATCC) ubicada en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, EE.UU., ZIP 20110-2209 el 10 de junio de 2004 y se denominaron LIB5444/62. La ATCC proveyó al solicitante de un recibo de depósito, asignando el nº de acceso al depósito ATCC PTA-6072.

Las bibliotecas de ADNc de alto peso molecular de gusano de la raíz del maíz, es decir, LIB5496 y LIB5498, se

prepararon esencialmente como se ha descrito anteriormente para la producción de bibliotecas de ADNc de gusano de la raíz del maíz. Las bibliotecas LIB5496 y LIB5498 se construyeron respectivamente a partir de conjuntos de ARNm obtenidos de larvas del gusano de la raíz del maíz occidental de primer (1 gramo) y segundo y tercer (1 gramo) estadio. Brevemente, los insectos se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Los insectos congelados se redujeron a un fino polvo moliendo en un mortero y pistilo. El ARN se extrajo usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se aisló ARN de poli A+ de la preparación de ARN total usando Dynabeads Oligo dT (DynaL Inc., NY). Se preparó una biblioteca de ADNc de alto peso molecular a partir de 20 microgramos de ARN de poli A+ usando el sistema de plásmido SuperScript™ (Invitrogen). El ADNc se fraccionó de tamaño sobre un gel de agarosa al 1% en TAE, y el ADNc entre el intervalo de 1 Kb a 10 Kb se recogió y se ligó en el vector pSPORT1 entre los sitios de restricción *SaI* y *NotI* y se transformó en células electro-competentes de DH10B de *E. coli* por electroporación. LIB5496 dio un título total de  $3,5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias. LIB5498 dio un título total de  $1,0 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias. Las colonias de las bibliotecas de ADNc de alto peso molecular de gusano de la raíz del maíz LIB5496 y LIB5498 se amplificaron individualmente en un medio de alta viscosidad. Aproximadamente 600.000 unidades formadoras de colonias de LIB5496 y LIB5498 se mezclaron sobre una placa con agitación por separado en 500 ml de medio LB que contenía 0,3% de SeaPrep Agarose® y 50 mg/l de carbenicilina a 37 °C y luego se enfriaron rápidamente en un baño de agua/hielo durante 1 hora permitiendo la suspensión uniforme de las colonias bacterianas. Las bibliotecas se cultivaron entonces a 30 °C durante 42 horas. Después de la incubación, las células se mezclaron durante 5 minutos sobre una placa con agitación. El medio se transfirió entonces a dos botellas de centrífuga de 250 ml. Las células bacterianas se sedimentaron a 10.000 xg durante 10 minutos. El medio se sacó de las botellas y las células se resuspendieron en un total de 20 ml de medio LB con 50 mg/l de carbenicilina. Se añadió sulfóxido de dimetilo al 10% para preservar las células en congelación. Ambas bibliotecas se amplificaron a un título final de  $10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro. La información de secuencias de ADNc insertadas se obtuvo de las bibliotecas de plásmido específicas para especie de gusano de la raíz del maíz.

Las bibliotecas de gusano de la raíz de Andersen y col., junto con secuencias adicionales de las bibliotecas LIB5444 y LIB5462, produjeron inicialmente 18.415 secuencias de EST individuales que consistieron en aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  residuos de nucleótidos. La longitud promedio de una secuencia de EST fue 586 residuos de nucleótidos. Estas secuencias de EST se sometieron a algoritmos bioinformáticos que produjeron el ensamblaje de secuencias de cóntigo denominadas en el presente documento UNIGENE, y secuencias de EST individuales que no pudieron compilarse por identidad de solapamiento con otras secuencias de EST se denominaron en el presente documento singletons. Las bibliotecas LIB5444 y LIB5462 se secuenciaron entonces mucho más profundamente, produciendo secuencias de EST individuales adicionales. Las secuencias de EST obtenidas de bibliotecas, es decir, LIB149, LIB150, LIB3027, LIB3373, LIB5444, LIB5462, LIB5496 y LIB5503, se exponen en el listado de secuencias de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 143 y SEC ID N°: 169 a SEC ID N°: 174.

Las secuencias de EST aisladas de bibliotecas de ADNc de CRW se ensamblaron, cuando fue posible, en conjuntos de UNIGENE y estas secuencias de UNIGENE ensambladas se enumeran en el listado de secuencias que se expone en. Un UNIGENE es una agrupación orientada de genes formada a partir del solapamiento de secuencias de EST individuales dentro de regiones de identidad de secuencias para formar una secuencia mayor. Pontius y col., Nucl Acids Res 31:28-33 (2003). Cada secuencia de nucleótidos como se expone en el listado de secuencias se analizó para identificar la presencia de marcos de lectura abiertos. La información de secuencias de aminoácidos deducida de los marcos de lectura abiertos se comparó con información de secuencias de aminoácidos conocida disponible en bases de datos públicas con el fin de deducir el grado de identidad de secuencias de aminoácidos o similitud con aquellas secuencias de aminoácidos conocidas. La función biológica, si la hay, asociada a secuencias de aminoácidos conocidas en bases de datos públicas se anotó para las secuencias de aminoácidos deducidas de la información de secuencias de nucleótidos de bibliotecas de ADNc. Las anotaciones proporcionaron información que fue sugerente de la función de una proteína que puede expresarse a partir de un gen particular que dio lugar a una secuencia de ADNc particular, pero no fue determinante del desenlace. Basándose en la información de la anotación sugerente, ciertas secuencias de ADNc se caracterizaron como aquellas que codificaron una proteína que participó probablemente en alguna función biológica dentro de células del gusano de la raíz del maíz que fue tanto esencial para la vida como que fue necesaria para asegurar la salud y vitalidad a una célula, o fue probable que participaran en integridad celular, mantenimiento celular y capacidad reproductora.

Se seleccionaron varias secuencias de ADNc a partir de este subconjunto de secuencias de ADNc que probablemente codificaba proteínas, cuya inhibición fue probable que produjera morbilidad o mortalidad a CRW o a otra especie de células invertebradas. Entonces, estas secuencias se usaron en la construcción de moléculas de ARN bicatenario para incorporación en la dieta de CRW.

Se diseñaron pares de cebadores de amplificación térmica basándose en las secuencias de ADNc informadas en la biblioteca de ADNc de CRW. Se construyeron pares de cebadores ambas como un par de secuencias de nucleótidos, presentando cada miembro de un par de cebadores complementariedad perfecta tanto con una secuencia sentido como con una antisentido. Algunas secuencias de pares de cebadores se construyeron de manera que cada miembro del par presentara una secuencia que contenía un promotor de ARN polimerasa del fago T7 en su extremo 5' como se expone,

por ejemplo, en SEC ID N°: 5 desde la posición de nucleótido 1 a la posición de nucleótido 23. Preferentemente se llevó a cabo una primera reacción de amplificación de alta fidelidad usando un primer par de cebadores que carecía de un promotor T7 para generar un primer amplicón usando ADN genómico de CRW como molde. Preferentemente se usa una secuencia de ADNc o de ARNm como molde para la síntesis de una molécula de ARNb para su uso en la presente invención debido a que las secuencias de genoma eucariota son reconocidas en la materia por contener secuencias que no están presentes dentro de la molécula de ARN madura. Entonces se usó una muestra del primer amplicón generado a partir de la primera reacción de amplificación de alta fidelidad como molde en una segunda reacción de amplificación térmica con un segundo par de cebadores que contenía la secuencia del promotor T7 para producir un segundo amplicón que contenía un promotor T7 en o incorporado dentro del extremo 5' de cada hebra del segundo amplicón. La secuencia de nucleótidos completa del segundo amplicón se obtuvo en ambas direcciones y en comparación con la secuencia de nucleótidos como se informa para el ADNc, y se anotaron las discrepancias entre las dos secuencias, si las hubo. Generalmente, las secuencias preparadas usando ADN del genoma como molde no estuvieron de acuerdo con el posterior uso como moléculas de ARNb para su uso en alcanzar niveles de supresión significativos debido a variaciones dentro de las secuencias de genoma que no estaban presentes dentro de la secuencia de ARNm o ADNc.

Una reacción de transcripción *in vitro* normalmente contuvo de 1 a 2 microgramos de molde de ADN linealizado, tampón de reacción de polimerasa T7 de un concentrado 10X, ribonucleótidos ATP, CTP, GTP y UTP a una concentración final de entre 50 y 100 mM cada uno, y 1 unidad de enzima ARN polimerasa T7. La reacción de ARN polimerasa se incubó a 37 °C, dependiendo de la temperatura óptima de la ARN polimerasa usada según las instrucciones del fabricante, durante un periodo de tiempo que osciló de varios minutos a varias horas. Generalmente, las reacciones se llevaron a cabo durante de 2 a 6 horas para la transcripción de secuencias de molde hasta 400 nucleótidos de longitud, y durante hasta 20 horas para transcripción de secuencias de molde de más de 400 nucleótidos de longitud. El calentar la reacción a 65 °C durante quince minutos termina la transcripción de ARN. Los productos de transcripción de ARN se precipitaron en etanol, se lavaron, se secaron al aire y se resuspendieron en agua libre de ARNs a una concentración de 1 microgramo por microlitro. La mayoría de los transcritos que se aprovecharon de la estrategia del promotor T7 opuesta brevemente explicada anteriormente produjeron ARN bicatenario en la reacción de transcripción *in vitro*, sin embargo, se obtuvo un mayor rendimiento de ARN bicatenario calentando el ARN purificado a 65 °C y luego enfriando lentamente hasta temperatura ambiente para garantizar la apropiada hibridación de segmentos de ARN sentido y antisentido. Los productos de ARN bicatenarios se incubaron entonces con ADNsa I y ARNs a 37 °C durante una hora para eliminar cualquier ADN o ARN monocatenario presente en la mezcla. Los productos de ARN bicatenario se purificaron sobre una columna según las instrucciones del fabricante (KIT DE ARNi MEGASCRIPT DE AMBION) y se resuspendieron en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) o agua libre de ARNs a una concentración de entre 0,1 y 1,0 microgramo por microlitro.

Una muestra de ARN bicatenario o bien se añadió directamente a cada pocillo que contenía dieta del insecto como se indica anteriormente, o bien se modificó antes de añadirse a la dieta del insecto. La modificación de ARN bicatenario siguió las instrucciones para ARNs III (AMBION CORPORATION, Austin, Texas) o DICER (STRATAGENE, La Jolla, California) proporcionadas por el fabricante. La digestión con ARNs III de ARN bicatenario produjo veintiuno y veintidós dúplex de nucleótidos que contenían extremos fosforilados en 5' y extremos de hidroxilo en 3' con 2-3 residuos protuberantes base, similar a los fragmentos de ARN interferente corto duplexado de ~21-26 pares de bases (ARNip) producidos por la enzima dicer en la ruta eucariota identificada por Hamilton y col. (Science, 1999, 286:950-952) y Elbashir y col. (Genes & Development, 2001, 15:188-200). Esta colección de dúplex de ARN interferente corto se purificó adicionalmente y una muestra se caracterizó por electroforesis en gel de poliacrilamida para determinar la integridad y eficiencia de la formación del dúplex. La pureza y cantidad de la muestra se determinó entonces mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 250 nanómetros, y la muestra sin usar se retuvo para el posterior uso por almacenamiento a -20 °C.

Las muestras de ARNip o ARN bicatenario (ARNb) de longitud completa se sometieron a bioensayo con un número de plagas diana seleccionado. Se aplicaron dosis variables de ARNb o ARNip como recubrimiento a dieta artificial de gusano de la raíz del maíz según el siguiente procedimiento. Se obtuvieron huevos de *Diabrotica virgifera virgifera* (WCR) de Crop Characteristics, Inc., Farmington, Minnesota. Los huevos de WCR no diapausantes se incubaron en tierra durante 13 días a 24 °C, 60% de humedad relativa, en completa oscuridad. En el día 13, la tierra que contenía los huevos de WCR se dispuso entre tamices de malla n° 30 y n° 60 y los huevos se lavaron de la tierra usando una manguera de jardín de alta presión. Los huevos se desinfectaron superficialmente humedeciendo en LYSOL durante tres minutos, se aclararon tres veces con agua estéril, se lavaron una vez con una disolución al 10% de formalina y luego se aclararon tres veces adicionales en agua estéril. Los huevos tratados de esta forma se dispensaron sobre filtros de café estériles y eclosionaron durante la noche a 27 °C, 60% de humedad relativa, en completa oscuridad. La dieta de insectos se preparó esencialmente según Pleau y col. (Entomologia Experimentalis et Applicata, 2002, 105:1-11) con las siguientes modificaciones. Se dispensaron 9,4 gramos de agar SERVA en 540 mililitros de agua purificada y se agitaron hasta que el agar se distribuyó minuciosamente. La mezcla de agua/agar se calentó a ebullición para disolver completamente el agar, y luego se vertió en una mezcladora WARING. La mezcladora se mantuvo a baja velocidad mientras que se añadieron 62,7 gramos de mezcla BIO-SERV DIET (F9757), 3,75 gramos de raíz de maíz liofilizada, 1,25 mililitros de colorante alimentario verde y 0,6 mililitros de formalina a la mezcla de agar caliente. La mezcla se ajustó entonces a pH 9,0 con la

5 adición de una disolución madre al 10% de hidróxido potásico. El volumen de aproximadamente 600 mililitros de dieta líquida se mezcló continuamente a alta velocidad y se mantuvo a de 48 °C a 60 °C usando una barra de agitación magnética recubierta con NALGENE esterilizada sobre una placa caliente de agitación magnética dispensada en alícuotas de 200 microlitros en cada pocillo de placas de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos FALCON. La dieta en las placas se dejó solidificar y secar al aire en una campana extractora biológica estéril durante diez minutos.

10 Volúmenes de treinta (30) microlitros de muestras de prueba que contenían tanto reactivos de control como ARN bicatenario en cantidades variables se recubrieron sobre la superficie de la dieta del insecto en cada pocillo usando un micro-pipeteador repetidor. La dieta de insectos se dejó reposar en una campana extractora biológica estéril durante hasta media hora después de la aplicación de las muestras de prueba para permitir que los reactivos difundieran en la dieta y para permitir que se secara la superficie de la dieta. Una larva neonata de WCR se depositó a cada pocillo con un pincel fino. Entonces, las placas se taparon con MYLAR y se ventilaron usando un afilador para insectos. Se probaron 12-72 larvas de insecto por dosis dependiendo del diseño del ensayo. Las placas de bioensayo se incubaron a 27 °C, 60% de humedad relativa, en oscuridad completa durante 12-14 días. El número de larvas supervivientes por dosis se registró en el momento de tiempo 12-14 días. La masa de larvas se determinó usando una microbalanza adecuada para cada larva superviviente. Los datos se analizaron usando el software estadístico JMP<sup>®</sup>4 (SAS Institute, 1995) y se realizó una ANOVA factorial completa con una prueba de Dunnett para buscar efectos del tratamiento en comparación con el control sin tratar (P<0,05). Se realizó una prueba a posteriori de Tukey-Kramer para comparar todos los pares de los tratamientos (P<0,05).

20 Las siguientes secuencias de nucleótidos se derivaron primero como secuencias de ADNc identificadas en una biblioteca de ADNc del intestino medio de gusano de la raíz del maíz (Andersen y col., arriba), y se adaptaron para su uso en construir moléculas de ARN bicatenario para su uso en probar la eficacia para inhibir una función biológica en una plaga alimentando moléculas de ARN bicatenario en la dieta de la plaga.

#### Una secuencia homóloga de Chd3

25 Se han identificado genes CHD en numerosos eucariotas, y se propone que las proteínas correspondientes funcionan como factores de remodelación de cromatina. El término CHD se deriva de los tres dominios de homología de las secuencias encontradas en proteínas CHD: un dominio cromo (modificador de la organización de cromatina), un dominio de helicasa/ATPasa relacionado con SNF2 y un dominio de unión a ADN, cada uno de los cuales se cree que confiere una actividad relacionada con cromatina distinta. Las proteínas CHD se separan en dos categorías basándose en la presencia o ausencia de otro dominio de homología de secuencias, un dominio de dedo de cinc PHD, normalmente asociado a actividad relacionada con cromatina. Las proteínas relacionadas con CHD3 poseen un dominio de dedo de cinc PHD, pero no las proteínas relacionadas con CHD1. Observaciones experimentales han sugerido una función para proteínas CHD3 en la represión de la transcripción, y en algunas especies se ha mostrado que es un componente de un complejo que contiene histona desacetilasa como subunidad. La desacetilación de histonas se correlaciona con inactivación transcripcional, y así se ha implicado que las proteínas CHD3 funcionan de represores de la transcripción en virtud de ser un componente de un complejo de histona desacetilasa (Ogas y col., 1999, PNAS 96:13839-13844). Así, la supresión de la síntesis de proteínas CHD3 puede ser una diana útil para la inhibición mediada por ARN bicatenario de plagas de invertebrados. La SEC ID N°: 4 se corresponde con una secuencia de nucleótidos de ADNc del intestino medio de CRW, cuya traducción de la secuencia de aminoácidos se anotó que era homóloga a una secuencia de aminoácidos de CHD3 de *Drosophila melanogaster* (n° de acceso de GenBank AF007780). SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 40609 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación del genoma directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, de conjuntos de ARNm de CRW, o de un ADNc producido a partir de tales conjuntos. La secuencia de un amplicón tal se corresponde con una parte de un gen de CRW que codifica un homólogo de una secuencia de aminoácidos de CHD3 de *D. melanogaster*. SEC ID N°: 5 contiene una secuencia del promotor de polimerasa T7 en su extremo 5' (nucleótidos 1-23) ligada a una secuencia de cebador del genoma de CRW (asignada arbitrariamente como la secuencia del cebador directo) representada como se expone en SEC ID N°: 5 desde la posición de nucleótido 24-45, que se corresponde con la posición de nucleótido 31 a la posición de nucleótido 52 como se expone en SEC ID N°: 4. SEC ID N°: 6, contiene una secuencia del promotor de polimerasa T7 en su extremo 5' como se expone desde la posición de nucleótido 1-23. La secuencia del promotor T7 está ligada en su extremo 3' a una secuencia de cebador del genoma inverso arbitrariamente asignada correspondiente a la posición de nucleótido 24-44 como se expone en SEC ID N°: 6, el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 4 desde la posición de nucleótido 298-319. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produce un amplicón de 335 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 7, correspondiente a una parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta el 66% de identidad con una secuencia de aminoácidos de CHD3 de *Drosophila melanogaster*. Los nucleótidos en la posición 1-23 y el complemento inverso de nucleótidos en la posición 314-335 como se expone en SEC ID N°: 7 se corresponden con las secuencias del promotor T7 en cualquier extremo del amplicón. La secuencia de nucleótidos genómica amplificada como se expone en SEC ID N°: 7 del nucleótido 24 al nucleótido 313 se corresponde sustancialmente con la secuencia de nucleótidos de ADNc informada como se expone en SEC ID N°: 4 del

nucleótido 31 al nucleótido 319, excepto que se informó que los nucleótidos en las posiciones 63, 87, 117, 177, 198, 213, 219-220, 246, 249 y 261 como se exponen en SEC ID N°: 4 eran T, T, G, G, G, T, T, T, C, C y A, respectivamente, mientras que las posiciones correspondientes en alineamiento con SEC ID N°: 7 contuvieron C, C, A, A, A, C, A, C, G A y G en las posiciones de nucleótidos 56, 80, 110, 170, 191, 206, 212-213, 239, 242 y 254. Esta diferencia se corresponde con una diferencia del 4% en la composición de la secuencia de nucleótidos entre la secuencia de ADNc previamente informada y la secuencia del amplicón producida a partir del molde de ADN del genoma, de acuerdo con el anterior informe de que la secuencia de ADNc era probablemente menos precisa del 99% (Andersen y col., arriba.).

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 7 se clonó en un vector de plásmido que puede replicarse en *E. coli* y se recuperaron suficientes cantidades de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del fragmento clonado. Se produjo ARN bicatenario y se sometió a bioensayo; un segmento de ARN que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 7 desde la posición de nucleótido 24 al menos a la posición de nucleótido 313, excepto que un residuo de uridina esté presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 7, siendo el otro segmento de ARN sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 7 desde la posición de nucleótido 313 al menos a la posición de nucleótido 24 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trató con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contenían 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubrieron sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se dejó que las larvas se alimentaran durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 4 presentaron inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

Otras secuencias de nucleótidos derivadas de CRW también se probaron en bioensayo en paralelo con las secuencias de CHD3 que incluían secuencias de nucleótidos anotadas por codificar probablemente equivalentes de CRW de proteínas tales como la proteína beta-tubulina, proteína de subunidad de V-ATPasa de 40 kDa, proteínas del factor de alargamiento EF1 $\alpha$  y EF1 $\alpha$  48D, proteína de subunidad p28 del proteosoma 26S, proteína epóxido hidrolasa de la hormona juvenil, proteína de los canales de cloruro dependiente de hinchazón, proteína glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa, proteína actina 42A, proteína factor 1 de ribosilación de ADP, factor de transcripción IIB, proteínas quitinasas y una enzima conjugadora con ubiquitina.

Una secuencia homóloga de beta-tubulina

Las proteínas tubulina son componentes estructurales importantes de muchas estructuras celulares en todas las células eucariotas y principalmente en la formación de microtúbulos. La inhibición de la formación de microtúbulos en células produce efectos catastróficos que incluyen interferencia con la formación de husos mitóticos y bloqueo de la división celular. Por tanto, la supresión de la formación de la proteína tubulina puede ser una diana útil para la inhibición mediada por ARN bicatenario.

Se identificó una secuencia derivada de CRW relacionada con beta-tubulina para su uso en la presente invención. SEC ID N°: 18 se corresponde con una secuencia de nucleótidos de ADNc del intestino medio de CRW, cuya traducción de la secuencia de aminoácidos se anotó que era homóloga en parte a una secuencia de aminoácidos de beta-1-tubulina de *Manduca sexta* y en parte a una secuencia de aminoácidos de beta-1-tubulina de *Drosophila melanogaster* (n° de acceso de GenBank AF030547 y M20419, respectivamente). SEC ID N°: 19 y SEC ID N°: 20 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación del genoma directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, de conjuntos de ARNm de CRW o de un ADNc producido a partir de tales conjuntos. La secuencia de un amplicón tal se corresponde con todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína beta-tubulina. SEC ID N°: 19 y SEC ID N°: 20 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos a partir de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-44 como se exponen en SEC ID N°: 19 se corresponden con los nucleótidos 96-116 como se expone en SEC ID N°: 18. Los nucleótidos 24-44 como se exponen en SEC ID N°: 20 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 18 a partir de los nucleótidos 428-448. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 19 y SEC ID N°: 20 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produce un amplicón de 399 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 21, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta identidad sustancial con un homólogo de la proteína beta-tubulina presente en *Drosophila melanogaster* y *Manduca sexta*. La secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 21 se corresponde sustancialmente con la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 18 a partir de los nucleótidos 96-448. No se observaron diferencias de secuencia entre la secuencia del amplicón del genoma y la secuencia correspondiente dentro de la secuencia de ADNc.

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 21 se clonó en un vector de plásmido, y se recuperaron cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produjo ARN

bicatenario y una muestra se sometió a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 21 desde la posición de nucleótido 24 al menos a la posición de nucleótido 376, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 21, el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 21 desde la posición de nucleótido 376 al menos a la posición de nucleótido 24 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trató con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contenían 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubrieron sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se dejó que las larvas se alimentaran durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 18 presentaron inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

Una secuencia homóloga de V-ATPasa de 40 kDa

El metabolismo energético dentro de orgánulos subcelulares en sistemas eucariotas es una función esencial. Las ATP sintasas vacuolares participan en el mantenimiento de niveles suficientes de ATP dentro de las vacuolas. Por tanto, las ATP sintasas vacuolares pueden ser una diana útil para la inhibición mediada por ARN bicatenario.

Una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que mostró similitud con una V-ATPasa de 40 kDa se derivó de CRW. Una traducción de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 32 presentó homología con una secuencia de aminoácidos de subunidad de V-ATPasa de 40 kDa de *Manduca sexta* (n° de acceso de GenBank X98825). SEC ID N°: 33 y SEC ID N°: 34 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación del genoma directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, conjuntos de ARNm de CRW, o un ADNc de CRW derivado de tales conjuntos. La secuencia de un amplicón tal debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga V-ATPasa de 40 kDa. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de un amplicón derivado usando ADN genómico de CRW como molde no estuvo de acuerdo con la secuencia de ADNc informada como se expone en SEC ID N°: 32.

SEC ID N°: 33 y SEC ID N°: 34 representan cebadores de amplificación térmica. Cada cebador contiene una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos desde las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-40 como se exponen en SEC ID N°: 33 se corresponden con los nucleótidos 95-111 como se exponen en SEC ID N°: 32. Los nucleótidos 24-43 como se exponen en SEC ID N°: 34 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 32 a partir de los nucleótidos 362-381. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 33 y SEC ID N°: 34 en una reacción de amplificación con molde de ADN genómico de CRW se produce un amplicón de 291 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 35. SEC ID N°: 35 del nucleótido 24 al nucleótido 268 presentó solo el 50% homología con la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 32 basándose en una alineamiento de ADN de Martínez/Needleman-Wunsch. La secuencia del amplicón derivada usando el par de cebadores de amplificación térmica seleccionado no estuvo de acuerdo con la secuencia informada como se expone en SEC ID N°: 32. Preferentemente, se produce un amplicón usando un conjunto de ARNm de CRW o un ADNc derivado de tal conjunto.

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 32 desde la posición de nucleótido 95 a la posición de nucleótido 381 se produjo y se clonó en un vector de plásmido, y se recuperaron cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produjo ARN bicatenario y una muestra se sometió a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 32 desde la posición de nucleótido 95 al menos a la posición de nucleótido 381, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 32, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 32 desde la posición de nucleótido 381 al menos a la posición de nucleótido 95 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trató con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contenían 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubrieron sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se dejó que las larvas se alimentaran durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 32 presentaron inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

Una secuencia homóloga de EF1 $\alpha$

Los factores de alargamiento de la transcripción y terminación de la transcripción son esenciales para el metabolismo y pueden ser dianas ventajosas para la inhibición mediada por ARN bicatenario.

Se identificaron al menos dos secuencias de ADNc de CRW para su uso en la presente invención que se predijo que

codificaban homólogos del factor de alargamiento 1 alfa (EF1 $\alpha$ ).

La traducción de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de ADNc de CRW de singletón como se expone en SEC ID N°: 36 presentó homología con una secuencia de aminoácidos de EF-1-alfa de *Drosophila melanogaster* (n° de acceso de GenBank X06870). También se identificaron otras secuencias que se predijo que codificaban proteínas homólogas a EF1 $\alpha$  de dentro de la biblioteca de intestino medio de ADNc de CRW. Estas secuencias se alinearon para producir una secuencia de UNIGENE como se expone en SEC ID N°: 40 que se predijo que codificaba un homólogo de la proteína EF1 $\alpha$  denominada en el presente documento 48D. Se predijo que varias de las secuencias comprendidas dentro de este singletón codificaban secuencias de aminoácidos que presentaban homología con diversas secuencias de proteína homóloga de EF1 $\alpha$  que incluyen, pero no se limitan a, EF1 $\alpha$  de *Bombyx mori* (n° de acceso de GenBank D13338), una EF1 $\alpha$  de la especie *Alternia* (n° de acceso de GenBank X03704), EF1 $\alpha$  de *Spragueia leo* (n° de acceso de GenBank U85680), EF1 $\alpha$  de *Apis mellifera* (n° de acceso de GenBank AF015267), EF1 $\alpha$  de *Anisakis simplex* (n° de acceso de GenBank AJ250539), EF1 $\alpha$  de la especie *Papaipema* (n° de acceso de GenBank AF151628), EF1 $\alpha$  de *Ephedrus persicae* (n° de acceso de GenBank Z83663), EF1 $\alpha$  de *Papilio garamas* (n° de acceso de GenBank AF044833), EF1 $\alpha$  de *Alysia lucicola* (n° de acceso de GenBank Z83667), EF1 $\alpha$  de la especie *Bracon* (n° de acceso de GenBank Z83669), EF1 $\alpha$  de *Histeromerus mystacinus* (n° de acceso de GenBank Z83666) y EF1 $\alpha$  de *Caenorhabditis elegans* (n° de acceso de GenBank U41534).

Una secuencia de ADNc de CRW predicha que codifica una parte de un homólogo de EF1 $\alpha$  se denomina en el presente documento la secuencia de B2 y se expone en SEC ID N°: 36. SEC ID N°: 37 y SEC ID N°: 38 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación del genoma directos e inversos (es decir, un par de cebadores, con referencia a secuencias correspondientes o de complemento inverso como se exponen en SEC ID N°: 36) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, conjuntos de ARNm de CRW, o de un ADNc derivado de tales conjuntos de ARNm. La secuencia de un amplicón tal debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de EF1 $\alpha$ . Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de un amplicón derivado cuando se usó ADN genómico de CRW como molde no estuvo de acuerdo con la secuencia de ADNc informada como se expone en SEC ID N°: 36.

SEC ID N°: 37 y SEC ID N°: 38 representan secuencias para cebadores de amplificación térmica. Cada cebador contiene una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos a partir de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-44 como se exponen en SEC ID N°: 37 se corresponden con los nucleótidos 8-29 como se exponen en SEC ID N°: 36. Los nucleótidos 24-42 como se exponen en SEC ID N°: 38 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 36 a partir de los nucleótidos 310-328. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 37 y SEC ID N°: 38 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produjo un amplicón de 933 pares de bases que comprendía la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 39. La secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 39 no estuvo de acuerdo con la secuencia de nucleótidos desde la posición de nucleótido 8 a la posición de nucleótido 328 como se expone en SEC ID N°: 36. Preferentemente se produce un amplicón usando un conjunto de ARNm de CRW o un ADNc derivado de tal conjunto tal como, por ejemplo, SEC ID N°: 36.

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 36 desde la posición de nucleótido 8 a la posición de nucleótido 328 se produjo usando conjuntos de ARNm de CRW o ADNc preparados a partir de tales conjuntos, y se clonó en un vector de plásmido. Se recuperaron cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produjo ARN bicatenario y una muestra se sometió a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 36 desde la posición de nucleótido 8 al menos a la posición de nucleótido 328, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 36, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 36 desde la posición de nucleótido 328 al menos a la posición de nucleótido 8 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trató con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contenían 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubrieron sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se dejó que las larvas se alimentaran durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 36 presentaron inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

La secuencia como se expone en SEC ID N°: 40 se usó para diseñar un par de cebadores para su uso en amplificar una secuencia de ADN genómico de CRW que codifica una secuencia de proteína homóloga de EF1 $\alpha$  48D. SEC ID N°: 41 y SEC ID N°: 42 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación del genoma directos e inversos (es decir, un par de cebadores). SEC ID N°: 41 y SEC ID N°: 42 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-41 como se exponen en SEC ID

Nº: 41 se corresponden con los nucleótidos 61-79 como se exponen en SEC ID Nº: 40. Los nucleótidos 24-45 como se exponen en SEC ID Nº: 42 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID Nº: 40 a partir de los nucleótidos 562-583. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID Nº: 41 y SEC ID Nº: 42 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde, se produce un amplicón de 569 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID Nº: 43, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta identidad sustancial con una proteína de EF1 $\alpha$  también presente en *Drosophila melanogaster*. La secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID Nº: 43 del nucleótido 24 al nucleótido 546 se corresponde sustancialmente con la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID Nº: 40 a partir de los nucleótidos 61-583. No se observaron diferencias de secuencia entre la secuencia del amplicón del genoma y la secuencia correspondiente dentro de la secuencia de ADNc.

El amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID Nº: 43 se clonó en un vector de plásmido, y se recuperaron cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produjo ARN bicatenario y una muestra se sometió a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID Nº: 43 desde la posición de nucleótido 24 al menos a la posición de nucleótido 546, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID Nº: 43, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID Nº: 43 desde la posición de nucleótido 546 al menos a la posición de nucleótido 24 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trató con DICER o con ARNs III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contenían 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubrieron sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se dejó que las larvas se alimentaran durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID Nº: 43 presentaron inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

Una secuencia homóloga de subunidad p28 del proteasoma 26S

El proteasoma 26S es una proteasa multi-subunidad dependiente de ATP grande que está altamente conservada en todos los eucariotas. Tiene una función general en la eliminación selectiva de diversas proteínas de corta vida que se ligan primero covalentemente a ubiquitina y luego son posteriormente degradadas por el complejo del proteasoma 26S. La ruta de ubiquitina desempeña una función importante en el control del ciclo celular por la degradación específica de varias proteínas reguladoras que incluyen ciclinas mitóticas e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas tales como p27 de células de mamífero. Así, la supresión de la síntesis del proteasoma 26S y la supresión de síntesis de sus subunidades componentes pueden ser dianas preferidas para la inhibición mediada por ARN bicatenario (Smith y col., Plant Phys. 1997, 113:281-291).

Se identificó que una secuencia de ADNc derivada de una biblioteca del intestino medio de CRW era parcialmente homóloga a una secuencia de aminoácidos de la subunidad del proteosoma 26S y se usó en la presente invención. SEC ID Nº: 44 se corresponde sustancialmente con una secuencia de nucleótidos de ADNc del intestino medio de CRW. Una traducción de la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 44 presentó homología con una proteína p28 de subunidad del proteasoma 26S (nº de acceso de GenBank AB009619). SEC ID Nº: 45 y SEC ID Nº: 46 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación del genoma directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, de conjuntos de ARNm de CRW, y de ADNc producido a partir de tales conjuntos. Un amplicón producido de esta forma debe presentar una secuencia que codifique toda o una parte de un gen de CRW que codifica un homólogo de una proteína de subunidad del proteasoma 26S. SEC ID Nº: 45 y SEC ID Nº: 46 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-46 como se exponen en SEC ID Nº: 45 se corresponden con los nucleótidos 130-152 como se exponen en SEC ID Nº: 34. Los nucleótidos 24-41 como se exponen en SEC ID Nº: 46 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID Nº: 44 a partir de los nucleótidos 423-440. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID Nº: 44 y SEC ID Nº: 46 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produjo un amplicón de 1113 pares de bases que comprendía la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID Nº: 47. La secuencia como se expone en SEC ID Nº: 47 no se correspondió con la secuencia como se expone en SEC ID Nº: 44, y por tanto no estuvo de acuerdo con la secuencia de ADNc informada como se expone en SEC ID Nº: 44. Se prefiere que un amplicón se produzca usando un conjunto de ARNm de CRW o un ADNc derivado de tal conjunto.

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID Nº: 44 del nucleótido 130 al nucleótido 440 se produjo y se clonó en un vector de plásmido, y se recuperaron cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produjo ARN bicatenario y una muestra se sometió a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID Nº: 44 desde la posición de nucleótido 130 al menos a la posición de nucleótido 440, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de

timidina se muestra en SEC ID N°: 44, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 44 desde la posición de nucleótido 440 al menos a la posición de nucleótido 110 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trató con DICER o con ARNsa III para producir cantidades

5 suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contenían 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubrieron sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se dejó que las larvas se alimentaran durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 44 presentaron inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

10 Una secuencia homóloga de epóxido hidrolasa de la hormona juvenil

La hormona juvenil de insecto controla y regula una variedad de procesos biológicos necesarios dentro del ciclo vital del insecto que incluye, pero no necesariamente se limita a, metamorfosis, reproducción y diapausa. Se requieren concentraciones de la hormona juvenil (JH) para llegar al máximo en momento apropiados dentro de la hemolinfa de la forma de larva de una plaga de insectos, en particular larvas de lepidópteros y coleópteros, y luego debe degradarse con el fin de terminar los efectos de la respuesta a hormona. Las enzimas implicadas en la disminución de la concentración de hormona juvenil son eficaces mediante dos rutas primarias de degradación metabólica. Una ruta implica esterasa de la hormona juvenil (JHE), que hidroliza el éster metílico proporcionando el ácido correspondiente. La segunda ruta utiliza epóxido hidrolasa de la hormona juvenil (JHEH) para lograr la hidrólisis del epóxido, produciendo la formación del diol. La contribución de JHE en la degradación de JH es bien entendida y se ha encontrado que es invariable entre las especies de lepidópteros y coleópteros. La inhibición de esterasa de la JH se ha asociado a cambios morfológicos graves que incluyen, pero no se limitan a, deambulación de larvas, pupación diferida y desarrollo de productos intermedios malformados. A diferencia, la contribución de JHEH en el metabolismo de JH es menos bien entendida y se ha mostrado que varía entre las especies, pero estudios recientes indican pruebas que sugieren que JHEH puede ser la ruta primaria del metabolismo de JH (Brandon J. Fetterolf, disertación doctoral, Universidad del Estado de Carolina del Norte (10 de febrero de 2002) Synthesis and Analysis of Mechanism Based Inhibitors of Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase from Insect *Trichoplusia ni*). En cualquier caso, la alteración de cualquier ruta de degradación de JH usando tecnología de supresión génica podría ser una diana eficaz para la inhibición de plagas mediada por ARN bicatenario.

15  
20  
25

Se identificó una secuencia homóloga derivada de CRW de epóxido hidrolasa de la hormona juvenil de insecto para su uso en la presente invención. SEC ID N°: 48 se corresponde sustancialmente con una secuencia de nucleótidos de ADNc del intestino medio de CRW. Una traducción de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 48 predijo homología con una epóxido hidrolasa de la hormona juvenil (JHEH) en *Manduca sexta* (n° de acceso de GenBank U46682). SEC ID N°: 49 y SEC ID N°: 50 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, conjuntos de ARNm de CRW, o un ADNc de CRW derivado de tales conjuntos. La secuencia de un amplicón tal debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de JHEH. SEC ID N°: 49 y SEC ID N°: 50 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-42 como se exponen en SEC ID N°: 49 se corresponden con los nucleótidos 7-26 como se exponen en SEC ID N°: 48. Los nucleótidos 24-44 como se exponen en SEC ID N°: 50 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 48 a partir de los nucleótidos 360-380. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 49 y SEC ID N°: 50 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produjo un amplicón de 95 pares de bases que comprendía la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 52. La secuencia de amplicón no se correspondió con la secuencia de ADNc como se expone en SEC ID N°: 48. Preferentemente, un amplicón se produce usando un conjunto de ARNm de CRW o un ADNc derivado de tal conjunto como secuencia de nucleótidos molde en la reacción de amplificación.

30  
35  
40

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 48 se clona en un vector de plásmido y se recuperan cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produce ARN bicatenario y una muestra se somete a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 48 desde la posición de nucleótido 7 al menos a la posición de nucleótido 380, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 48, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 48 desde la posición de nucleótido 380 al menos a la posición de nucleótido 7 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trata con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubren sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 48 presentan inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

45  
50  
55

Una secuencia homóloga de proteína de los canales de cloruro dependiente de hinchazón

Se ha postulado que las proteínas de canales de cloruro dependientes de hinchazón desempeñan una función crítica en la osmorregulación en sistemas de células de animales eucariotas. Por tanto, una secuencia de nucleótidos que presenta la capacidad para expresar una secuencia de aminoácidos que presenta homología con proteínas de canales de cloruro dependientes de hinchazón previamente identificadas puede ser una diana útil para inhibición de ARN en una plaga.

Un homólogo de secuencia de aminoácidos de canales de cloruro dependientes de hinchazón (SDCC) se dedujo de una biblioteca de ADNc de CRW y se usó en la presente invención. SEC ID N°: 53 se corresponde sustancialmente con una secuencia de nucleótidos de ADNc del intestino medio de CRW. Se determinó que la traducción de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 53 era homóloga a una proteína de SDCC en el pez cebra *Danio rerio* (n° de acceso de GenBank Y08484). SEC ID N°: 54 y SEC ID N°: 55 SEC ID N°: 55 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación térmica directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, de conjuntos de ARNm de CRW, o de ADNc derivado de tales conjuntos. La secuencia de un amplicón tal debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de SDCC. SEC ID N°: 54 y SEC ID N°: 55 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-43 como se exponen en SEC ID N°: 54 se corresponden con los nucleótidos 78-97 como se exponen en SEC ID N°: 53. Los nucleótidos 24-41 como se exponen en SEC ID N°: 55. SEC ID N°: 55 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 53 a partir de los nucleótidos 332-349. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 54 y SEC ID N°: 55 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produce un amplicón de 318 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 56, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta identidad sustancial con una proteína de SDCC. La secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 56 del nucleótido 24 al nucleótido 295 se corresponde sustancialmente con la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 53 a partir de los nucleótidos 78-349.

El amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 56 se clona en un vector de plásmido, y se recuperan cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produce ARN bicatenario y una muestra se somete a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 56 desde la posición de nucleótido 24 al menos a la posición de nucleótido 295, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 56, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 56 desde la posición de nucleótido 295 al menos a la posición de nucleótido 24 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trata con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubren sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 56 presentan inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

Una secuencia homóloga de proteína glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa

La proteína glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa (G6PD) cataliza la oxidación de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato mientras que se reduce concomitantemente la forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP+) a NADPH. NADPH se conoce en la técnica como un cofactor requerido en muchas reacciones biosintéticas eucariotas, y se sabe que mantiene el glutatión en su forma reducida. El glutatión reducido actúa de secuestrante de metabolitos oxidativos peligrosos en células eucariotas, y con la ayuda de la enzima glutatión peroxidasa, convierte peróxido de hidrógeno nocivo en agua (Beutler y col., 1991, N. Engl. J. Med. 324:169-174). Por tanto, G6PD puede ser una diana preferible para la inhibición mediada por ARN bicatenario en una plaga de invertebrados.

Una secuencia homóloga de aminoácidos de la proteína glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa (G6PD) se dedujo de una biblioteca de ADNc de CRW y se usó en la presente invención. SEC ID N°: 57 se corresponde sustancialmente con una secuencia de nucleótidos de ADNc del intestino medio de CRW. Se determinó que la traducción de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 57 presentaba homología con una proteína G6PD en una especie de madrilla (n° de acceso de GenBank U72484). SEC ID N°: 58 y SEC ID N°: 59 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación del genoma directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, de conjuntos de ARNm de CRW, o de ADNc derivado de tales conjuntos. La secuencia de un amplicón tal debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de G6PD. SEC ID N°: 58 y SEC ID N°: 59 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-46 como se exponen en SEC ID N°: 58 se corresponden con los nucleótidos 113-136 como se exponen en SEC ID N°: 57. Los nucleótidos 24-45 como se exponen en SEC ID N°: 59 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 57 a partir de los nucleótidos 373-394. Usando el

par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 58 y SEC ID N°: 59 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produce un amplicón de 328 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 60, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta homología con una proteína G6PD. La secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 60 del nucleótido 24 al nucleótido 305 se corresponde sustancialmente con la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 57 a partir de los nucleótidos 113-394.

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 60 se clona en un vector de plásmido, y se recuperan cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produce ARN bicatenario y una muestra se somete a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 60 desde la posición de nucleótido 24 al menos a la posición de nucleótido 305, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 60, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 60 desde la posición de nucleótido 305 al menos a la posición de nucleótido 24 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trata con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubren sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 60 presentan inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

Una secuencia homóloga de proteína de Act42A

La actina es una proteína eucariota ubicua y altamente conservada requerida para la motilidad y locomoción celular (Lovato y col., 2001, *Insect Mol. Biol.* 20:333-340). Se identificaron varias secuencias de ADNc de CRW que se predijo que codificaban probablemente actina o proteínas que presentaban estructura de secuencias de aminoácidos relacionada con proteínas de actina. Por tanto, los genes que codifican de homólogos de actina en una célula de plaga puede ser dianas útiles para la inhibición mediada por ARN bicatenario.

Una agrupación UNIGENE identificada dentro de una biblioteca de ADNc del intestino medio de gusano de la raíz del maíz (Agrupación 156\_1) consistió en varias secuencias de EST de singletón que predijeron cada una que codificaban toda o parte de proteínas homólogas de actina. Tras el alineamiento de estos singletones en la agrupación, se derivó una secuencia consenso como se expone en SEC ID N°: 61 que predijo que codificaba un homólogo de la proteína de actina. Las secuencias de la proteína de actina homóloga dentro del grupo de anotación incluyeron, pero no se limitaron a, fragmentos de actina 3 de *Drosophila melanogaster*, una actina A3a de citoplasmina de *Helicoverpa armigera* (n° de acceso de GenBank X97614), una actina de *Drosophila melanogaster* (n° de acceso de GenBank X06383), una secuencia de ARN mensajero de actina de *Saccoglossus kowalevskii* de hemicordato, y una actina de *Strongylocentrotus purpuratus* (n° de acceso de GenBank X05739).

SEC ID N°: 62 y SEC ID N°: 63 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación del genoma directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, conjuntos de ARNm de CRW, o de un ADNc derivado de tales conjuntos. La secuencia de un amplicón tal debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de actina. SEC ID N°: 62 y SEC ID N°: 63 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-45 como se exponen en SEC ID N°: 62 se corresponden con los nucleótidos 14-35 como se exponen en SEC ID N°: 61. Los nucleótidos 24-45 como se exponen en SEC ID N°: 63 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 61 a partir de los nucleótidos 449-470. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 62 y SEC ID N°: 63 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produce un amplicón de 503 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 64, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta homología con una proteína actina. La secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 64 del nucleótido 24 al nucleótido 480 se corresponde sustancialmente con la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 61 a partir de los nucleótidos 14-470.

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 64 se clona en un vector de plásmido, y se recuperan cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produce ARN bicatenario y una muestra se somete a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 64 desde la posición de nucleótido 24 al menos a la posición de nucleótido 480, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 64, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 64 desde la posición de nucleótido 480 al menos a la posición

de nucleótido 24 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trata con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubren sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 64 presentan inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

Una secuencia homóloga de factor 1 de ribosilación de ADP

Se ha demostrado que los factores de ribosilación de ADP son esenciales en la función celular porque desempeñan funciones integrales en los procesos de reparación de daño de ADN, carcinogénesis, muerte celular y estabilidad genómica. Así, sería útil poder alterar selectivamente la transcripción de factores de ribosilación de ADP en especies de plagas de invertebrados usando la inhibición mediada por ARN bicatenario.

Se identificaron varias secuencias de ADNc de CRW que se predijo que codificaban secuencias de aminoácidos que presentaban homología con proteínas de factor de ribosilación de ADP. Una agrupación UNIGENE en particular (Agrupación 88\_1) estuvo compuesta de treinta (30) singletons de EST que se predijo que cada uno codificaba toda o parte de proteínas homólogas de actina. Tras el alineamiento de estos singletons en la agrupación, se derivó una secuencia consenso como se expone en SEC ID N°: 65. Una traducción de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de ADNc de CRW de singleton que comprende esta agrupación predijo una secuencia de aminoácidos que presenta homología con homólogos del factor de ribosilación de ADP. Las secuencias de proteína del factor de ribosilación de ADP que presentaban homología significativa con la secuencia de aminoácidos deducida del ORF dentro de SEC ID N°: 65 incluyeron, pero no se limitaron a, un factor de ribosilación de ADP de *Drosophila melanogaster* (n° de acceso de GenBank Y10618), un factor de ribosilación de ADP de *Drosophila obscura* (n° de acceso de GenBank AF025798), un factor de ribosilación de ADP de *Anopheles gambiae* (n° de acceso de GenBank L11617) y un factor de ribosilación de ADP de mosca californiana australiana (*Lucilia cuprina*) (n° de acceso de GenBank AF218587).

SEC ID N°: 66 y SEC ID N°: 67 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, conjuntos de ARNm de CRW, o de secuencias de ADNc derivadas de tales conjuntos. La secuencia de un amplicón tal debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de factor de ribosilación de ADP. SEC ID N°: 66 y SEC ID N°: 67 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-42 como se exponen en SEC ID N°: 66 se corresponden con los nucleótidos 70-88 como se exponen en SEC ID N°: 65. Los nucleótidos 24-40 como se exponen en SEC ID N°: 67 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 65 a partir de los nucleótidos 352-368. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 66 y SEC ID N°: 67 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produce un amplicón de 345 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 68, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta homología con una proteína de factor de ribosilación de ADP. La secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 68 del nucleótido 24 al nucleótido 322 se corresponde sustancialmente con la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 65 a partir de los nucleótidos 70-368.

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 68 se clona en un vector de plásmido, y se recuperan cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produce ARN bicatenario y una muestra se somete a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 68 desde la posición de nucleótido 24 al menos a la posición de nucleótido 322, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 68, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 68, desde la posición de nucleótido 322 al menos a la posición de nucleótido 24 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trata con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubren sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 68 presentan inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

Una secuencia homóloga de proteína de factor de transcripción IIB

Los factores de alargamiento de la transcripción y terminación de la transcripción, como se indica anteriormente, son esenciales para el metabolismo y pueden ser dianas ventajosas para la inhibición mediada por ARN bicatenario para controlar o eliminar infestación de plagas de invertebrados.

Se identificó una secuencia de ADNc de CRW que se predijo que codificaba una secuencia de aminoácidos que presentaba homología con una proteína de factor de transcripción IIB. SEC ID N°: 69 sirvió de base para construir un par de cebadores para su uso en amplificar una secuencia de dentro del genoma de CRW que codificaba el ARNm que formaba la base para esta secuencia de ADNc.

5 SEC ID N°: 70 y SEC ID N°: 71 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación térmica directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, de conjuntos de ARNm de CRW, o de ADNc derivado de tales conjuntos. La secuencia de un amplicón tal debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de factor de transcripción IIB. SEC ID N°: 70 y SEC ID N°: 71 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-44 como se exponen en SEC ID N°: 70 se corresponden con los nucleótidos 4-24 como se exponen en SEC ID N°: 69. Los nucleótidos 24-44 como se exponen en SEC ID N°: 71 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 69 a partir de los nucleótidos 409-429. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 70 y SEC ID N°: 71 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produce un amplicón de 472 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 72, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta homología con una proteína de factor de transcripción IIB. La secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 72 del nucleótido 24 al nucleótido 449 se corresponde sustancialmente con la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 69 a partir de los nucleótidos 4-429.

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 72 se clona en un vector de plásmido, y se recuperan cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produce ARN bicatenario y una muestra se somete a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 72 desde la posición de nucleótido 24 al menos a la posición de nucleótido 449, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 72, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 72, desde la posición de nucleótido 449 al menos a la posición de nucleótido 24 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trata con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubren sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 72 presentan inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

#### Secuencias homólogas de quitinasa

La quitina es un  $\beta(1 \rightarrow 4)$  homopolímero de N-acetilglucosamina y se encuentra en exoesqueletos de insecto. La quitina se forma a partir de UDP-N-acetilglucosamina en una reacción catalizada por quitina sintasa. La quitina es un polisacárido homopolímero estructural, y hay muchas etapas enzimáticas que participan en la construcción de esta estructura altamente ramificada y reticulada. La quitina da forma, rigidez y soporte a insectos y proporciona un andamiaje al que están unidos órganos internos tales como los músculos. La quitina debe también degradarse a cierto punto para mediar en las etapas que participan en el proceso de muda de piel del insecto. Por tanto, se cree que la inhibición mediada por ARN bicatenario de proteínas en estas rutas sería útil como medio para controlar la infestación de plagas de invertebrados.

Se identificó información de secuencias de aminoácidos a partir de la traducción de secuencias de bibliotecas de ADNc del intestino medio de gusano de la raíz del maíz que presentaron homología con proteínas quitinasa. Se generó una secuencia consenso de quitinasa (Agrupación UNIGENE n° 716\_1; SEC ID N°: 73) a partir del alineamiento de dos secuencias de EST de singletón. Se generó una segunda secuencia consenso de quitinasa (Agrupación UNIGENE n° 1238\_1; SEC ID N°: 77) a partir del alineamiento de cuatro secuencias de singletón. Las traducciones de secuencias de aminoácidos derivadas de ORF dentro de estas UNIGENE se anotaron por una secuencia de aminoácidos de quitinasa de escarabajo de la mostaza (*Phaedon cochleariae*) (n° de acceso de GenBank Y18011). SEC ID N°: 73 y SEC ID N°: 77 sirvieron de base para construir pares de cebadores para su uso en amplificar dos secuencias de dentro del genoma de CRW, de conjuntos de ARNm de CRW, o de secuencias de ADNc derivadas de tales conjuntos de ARNm. La secuencia de nucleótidos de tales amplicones debe corresponderse con todo o una parte de un gen que codifica una proteína homóloga de quitinasa.

SEC ID N°: 74 y SEC ID N°: 75 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación térmica directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón a partir de secuencias de nucleótidos derivadas de un gusano de la raíz del maíz. La secuencia de un amplicón tal debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW como se expone en SEC ID N°: 73 que codifica una proteína homóloga de quitinasa. SEC ID N°: 74 y SEC ID N°: 75 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-

23 respectivamente. Los nucleótidos 24-42 como se exponen en SEC ID N°: 74 se corresponden con los nucleótidos 1-19 como se exponen en SEC ID N°: 73. Los nucleótidos 24-47 como se exponen en SEC ID N°: 75 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 73 a partir de los nucleótidos 470-493. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 74 y SEC ID N°: 75 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produce un amplicón de 472 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 76, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta homología con una proteína quitinasa. La secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 76 del nucleótido 24 al nucleótido 516 se corresponde sustancialmente con la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 76 a partir de los nucleótidos 1-493.

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 76 se clona en un vector de plásmido, y se recuperan cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produce ARN bicatenario y una muestra se somete a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 76 desde la posición de nucleótido 24 al menos a la posición de nucleótido 516, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 76, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 76, desde la posición de nucleótido 516 al menos a la posición de nucleótido 24 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trata con DICER o con ARNs III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubren sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 76 presentan inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

SEC ID N°: 78 y SEC ID N°: 79 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación del genoma directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, conjuntos de ARNm de CRW, o de secuencias de ADNc derivadas de tales conjuntos de ARNm. La secuencia de un amplicón tal debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW como se expone en SEC ID N°: 77 que codifica una proteína homóloga de quitinasa. SEC ID N°: 78 y SEC ID N°: 79 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-44 como se exponen en SEC ID N°: 78 se corresponden con los nucleótidos 64-84 como se exponen en SEC ID N°: 77. Los nucleótidos 24-44 como se exponen en SEC ID N°: 79 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 77 a partir de los nucleótidos 779-799. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 78 y SEC ID N°: 79 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produjo un amplicón de 912 pares de bases que comprendía la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 80. Un alineamiento de la secuencia de ADNc como se expone en SEC ID N°: 77 y la secuencia de amplicón revelaron que había desemejanza sustancial entre las dos secuencias, resultando solo en un 32% de identidad de secuencias. Preferentemente, un amplicón se produce usando pares de cebadores tales como estos como se exponen en SEC ID N°: 's 78 y 79 y ARNm o ADNc como molde con el fin de evitar tales incongruencias.

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente sustancialmente a SEC ID N°: 77 se clona en un vector de plásmido, y se recuperan cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produce ARN bicatenario y una muestra se somete a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 77 desde la posición de nucleótido 64 al menos a la posición de nucleótido 799, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 77, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 77, desde la posición de nucleótido 799 al menos a la posición de nucleótido 64 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trata con DICER o con ARNs III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubren sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contiene ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 77 presentan inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

Una secuencia homóloga de enzima conjugadora con ubiquitina

La ruta de ubiquitina desempeña una función importante en el control del ciclo celular por la degradación específica de varias proteínas reguladoras que incluyen ciclinas mitóticas e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas tales como p27 de células de mamífero. Así, genes que codifican ubiquitina y componentes asociados pueden ser una diana preferida para la inhibición mediada por ARN bicatenario. (Smith y col., Plant Phys. 1997, 113:281-291). La ruta proteolítica dependiente de ubiquitina es una de las principales rutas por las que proteínas intracelulares se destruyen selectivamente

en eucariotas. La conjugación de ubiquitina con proteínas de sustrato está mediada por una variedad sorprendentemente diversa de enzimas. La elección de diana proteolítica también puede regularse en etapas entre la ubiquitinación del sustrato y su degradación a péptidos por la proteasa multi-subunidad 26S. La complejidad del sistema de ubiquitina sugiere una función central para la renovación de proteínas en regulación de células eucariotas, e implica otras proteínas en la ruta que incluyen enzima activadora de ubiquitina, enzima conjugadora con ubiquitina, ubiquitina-proteína ligasa, y componentes de subunidad del proteasoma 26S. Por tanto, se cree que la inhibición mediada por ARN bicatenario de proteínas en esta ruta sería útil como medio para controlar la infestación de plagas de invertebrados.

Se identificó una secuencia de la biblioteca de ADNc de CRW que se predijo que codificaba una secuencia de aminoácidos que presentaba homología con una enzima conjugadora de ubiquitina. SEC ID N°: 81 sirvió de base para construir un par de cebadores para su uso en producir un amplicón que comprendía toda o una parte de una enzima conjugadora de ubiquitina de gusano de la raíz del maíz.

SEC ID N°: 82 y SEC ID N°: 83 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación del genoma directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, de conjuntos de ARNm de CRW, o de un ADNc derivado de tales conjuntos de ARNm. La secuencia de tal amplicón debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de enzima conjugadora de ubiquitina. SEC ID N°: 82 y SEC ID N°: 83 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-42 como se exponen en SEC ID N°: 82 se corresponden con los nucleótidos 16-34 como se exponen en SEC ID N°: 81. Los nucleótidos 24-42 como se exponen en SEC ID N°: 83 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 81 a partir de los nucleótidos 295-313. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 82 y SEC ID N°: 83 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produce un amplicón de 344 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 84, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta homología con una enzima conjugadora de ubiquitina. La secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 84 del nucleótido 24 al nucleótido 321 se corresponde sustancialmente con la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 81 a partir de los nucleótidos 16-313.

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 84 se clona en un vector de plásmido, y se recuperan cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produce ARN bicatenario y una muestra se somete a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 84 desde la posición de nucleótido 24 al menos a la posición de nucleótido 253, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 84, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 84, desde la posición de nucleótido 253 al menos a la posición de nucleótido 24 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trata con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubren sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 84 presentan inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

Una secuencia homóloga de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

La ruta glicolítica es una ruta esencial en la mayoría de los organismos y participa en la producción de energía metabólica a partir de la degradación de glucosa. Una enzima importante en el segundo estadio de la ruta glicolítica es la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) que, en presencia de NAD<sup>+</sup> y fosfato inorgánico, cataliza la oxidación de 3-fosfo-gliceraldehído a 3-fosfogliceril-fosfato junto con formación de NADH. El componente importante de esta reacción es el almacenamiento de energía mediante la formación de NADH. Los genes que codifican enzimas asociadas a la ruta glicolítica, y particularmente genes que codifican enzimas que participan en las etapas útiles en la formación de reservas de energía, pueden ser dianas particularmente útiles para la inhibición mediada por ARN bicatenario en especies de plagas de invertebrados.

Se identificó una secuencia de biblioteca de la ADNc de CRW que se predijo que codificaba una secuencia de aminoácidos que presenta homología con una proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). La secuencia consenso para la agrupación expuesta en SEC ID N°: 85 se ensambló a partir de las secuencias solapantes de tres secuencias de EST de singletón. Una traducción de la secuencia de aminoácidos de un ORF dentro de la secuencia de nucleótidos SEC ID N°: 85 presentó homología con una secuencia de aminoácidos de G3PDH derivada de un gen G3PDH de *Cryptococcus curvatus* (n° de acceso de GenBank AF126158) y con una secuencia de aminoácidos de la proteína G3PDH del organismo *Drosophila pseudoobscura* (n° de acceso de GenBank AF025809). Así, se predijo que una traducción de la secuencia de aminoácidos de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 85 era una parte de una proteína de la enzima G3PDH de CRW. La secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 85 sirvió de base

para construir un par de cebadores de amplificación térmica para su uso en amplificar una secuencia que codifica una secuencia de la enzima G3PDH de CRW.

SEC ID N°: 86 y SEC ID N°: 87 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación térmica directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de secuencias de nucleótidos de CRW, cualquier ADN del genoma, conjuntos de ARNm, o de secuencias de ADNc derivadas de tales conjuntos de ARNm. La secuencia de un amplicón tal debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de G3PDH. SEC ID N°: 86 y SEC ID N°: 87 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-45 como se exponen en SEC ID N°: 86 se corresponden con los nucleótidos 103-124 como se exponen en SEC ID N°: 85. Los nucleótidos 24-45 como se exponen en SEC ID N°: 87 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 85 a partir de los nucleótidos 573-594. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 86 y SEC ID N°: 87 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produce un amplicón de 538 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 88, correspondiente sustancialmente a una parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta homología con una enzima conjugadora de ubiquitina. La secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 88 del nucleótido 24 al nucleótido 515 se corresponde sustancialmente con la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 85 a partir de los nucleótidos 103-594.

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 88 se clona en un vector de plásmido, y se recuperan cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produce ARN bicatenario y una muestra se somete a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 88 desde la posición de nucleótido 24 al menos a la posición de nucleótido 515, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 88, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 88, desde la posición de nucleótido 515 al menos a la posición de nucleótido 24 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trata con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubren sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 88 presentan inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

Una secuencia homóloga de ubiquitina B

Como se ha descrito anteriormente, la ruta de degradación de la proteína ubiquitina desempeña una función importante en el control del ciclo celular por la degradación específica de varias proteínas reguladoras que incluyen ciclinas mitóticas e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas tales como p27 de células de mamífero. Así, genes que codifican ubiquitina y componentes asociados pueden ser una diana preferida para la inhibición mediada por ARN bicatenario (Smith y col., Plant Phys. 1997, 113:281-291).

Se identificó una secuencia de la biblioteca de ADNc de CRW que se predijo que codificaba una secuencia de aminoácidos que presentaba homología con una proteína designada en el presente documento ubiquitina B. La secuencia consenso para la agrupación UNIGENE expuesta en SEC ID N°: 89 se ensambló a partir de las secuencias solapantes de cuatro secuencias de EST de singletón. Una traducción de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 89 presentó homología con una secuencia de aminoácidos de poliubiquitina de *Amoeba proteus* (n° de acceso de GenBank AF034789) y con una secuencia de proteínas de ubiquitina de *Drosophila melanogaster* (n° de acceso de GenBank M22428). Así, se creyó que una traducción de la secuencia de aminoácidos de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 89 codificaba una ubiquitina B. SEC ID N°: 89 sirvió de base para construir un par de cebadores para su uso en una reacción de amplificación térmica para amplificar una secuencia de nucleótidos que codificaba toda o una parte de una secuencia de aminoácidos de ubiquitina B de gusano de la raíz del maíz.

SEC ID N°: 90 y SEC ID N°: 91 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación térmica directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón a partir de secuencias de nucleótidos derivadas de CRW, cualquier ADN genómico, conjuntos de ARNm, o ADNc derivado de tales conjuntos de ARNm. La secuencia de un amplicón tal debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de ubiquitina B. SEC ID N°: 90 y SEC ID N°: 91 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-23 respectivamente. Los nucleótidos 24-40 como se exponen en SEC ID N°: 90 se corresponden con los nucleótidos 62-78 como se exponen en SEC ID N°: 89. Los nucleótidos 24-47 como se exponen en SEC ID N°: 91 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 89 a partir de los nucleótidos 399-422. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 90 y SEC ID N°: 91 en una reacción de amplificación con ADN genómico de CRW como molde se produce un amplicón de 407 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 92, correspondiente sustancialmente a una

parte del genoma de CRW que codifica una proteína que presenta homología con una enzima conjugadora de ubiquitina. La secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 92 del nucleótido 24 al nucleótido 384 se corresponde sustancialmente con la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 89 a partir de los nucleótidos 62-422.

5 El amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 92 se clona en un vector de plásmido, y se recuperan cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produce ARN bicatenario y una muestra se somete a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 92 desde la posición de nucleótido 24 al menos a la posición de nucleótido 384, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 92, y el  
10 segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 92, desde la posición de nucleótido 384 al menos a la posición de nucleótido 24 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trata con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubren sobre bioensayo de dieta de CRW  
15 como se ha descrito anteriormente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 92 presentan inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

Un homólogo de esterasa de la hormona juvenil

20 Como se indica anteriormente, la hormona juvenil de insecto controla y regula una variedad de procesos biológicos necesarios dentro del ciclo celular del insecto que incluyen, pero no necesariamente limitados a, metamorfosis, reproducción y diapausa. La alteración de la síntesis de JH o rutas de degradación usando tecnología de supresión génica podría ser una diana eficaz para inhibición de plagas mediada por ARN bicatenario.

Se identificó una secuencia homóloga derivada de CRW de esterasa de la hormona juvenil de insecto para su uso en la presente invención. SEC ID N°: 93 se corresponde sustancialmente con una secuencia de nucleótidos de ADNc del  
25 intestino medio de CRW. Una traducción de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 93 predijo homología con una esterasa de la hormona juvenil (JHE). SEC ID N°: 94 y SEC ID N°: 95 se corresponden respectivamente con cebadores de amplificación directos e inversos (es decir, un par de cebadores) para su uso en producir un amplicón de ADN genómico de CRW, conjuntos de ARNm de CRW, o un ADNc de CRW derivado de tales conjuntos. La secuencia de un amplicón tal debe corresponderse con todo o una parte de un gen de CRW que codifica una proteína homóloga de JHE. SEC ID N°: 94 y SEC ID N°: 95 contienen cada una una secuencia del promotor T7 de 23 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1-  
30 23 respectivamente. Los nucleótidos 24-45 como se exponen en SEC ID N°: 94 se corresponden con los nucleótidos 58-79 como se exponen en SEC ID N°: 93. Los nucleótidos 24-46 como se exponen en SEC ID N°: 95 se corresponden con el complemento inverso de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 93 a partir de los nucleótidos 338-360. Usando el par de cebadores que consiste en SEC ID N°: 94 y SEC ID N°: 95 en una reacción de amplificación con ADN genómico de  
35 CRW como molde se produjo un amplicón de 348 pares de bases que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 170. Preferentemente, un amplicón se produce usando un conjunto de ARNm de CRW o un ADNc derivado de tal conjunto como secuencia de nucleótidos molde en la reacción de amplificación.

Un amplicón que presenta la secuencia correspondiente a SEC ID N°: 170 se clona en un vector de plásmido, y se recuperan cantidades suficientes de ADN de plásmido para permitir la transcripción de ARN polimerasa T7 *in vitro* a partir  
40 de los promotores T7 convergentes incorporados en cualquier extremo del amplicón clonado. Se produce ARN bicatenario y una muestra se somete a bioensayo; un segmento de ARN, la hebra codificante, que consiste en la secuencia como se expone en SEC ID N°: 170 desde la posición de nucleótido 45 al menos a la posición de nucleótido 302, excepto que un residuo de uridina está presente en cada posición en la que un residuo de timidina se muestra en SEC ID N°: 96, y el segmento de ARN de complemento inverso, o la hebra no codificante, siendo sustancialmente el complemento inverso de  
45 la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 170 desde la posición de nucleótido 302 al menos a la posición de nucleótido 45 uridinas apropiadamente posicionadas en lugar de timidinas. Una muestra de ARN bicatenario (ARNb) se trata con DICER o con ARNsa III para producir cantidades suficientes de ARN interferente pequeño (ARNip). Las muestras que contienen 0,15 partes por millón de ARNip o ARNb se recubren sobre bioensayo de dieta de CRW como se ha descrito anteriormente y se deja que las larvas se alimenten durante 13 días. Las larvas de CRW que se  
50 alimentaron con dieta que contenía ARNb correspondiente a toda o una parte de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 170 presentan inhibición significativa del crecimiento y mortalidad en comparación con controles.

Diez de las moléculas de ARN bicatenario enumeradas anteriormente se probaron en bioensayo en paralelo con ARN interferente pequeño generado a partir de las moléculas de ARN bicatenario. Muestras de secuencias de ARN bicatenario o muestras de ARN interferente pequeño preparadas a partir de las muestras de secuencias de ARN bicatenario, cada  
55 una correspondiente a secuencias de aminoácidos anotadas para homólogos de genes diana seleccionados que incluyen un homólogo de V-ATPasa de 40 kDa, un homólogo de EF-1-alfa, un homólogo de la subunidad p28 del proteasoma 26S, un homólogo de epóxido hidrolasa de la hormona juvenil, un homólogo de CHD3, un homólogo de beta-tubulina, dos

homólogos de quitinasa, un homólogo de factor de transcripción IIB y un homólogo de esterasa de la hormona juvenil (correspondientes respectivamente a SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 47, SEC ID N°: 52, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 76, SEC ID N°: 80, SEC ID N°: 72, y SEC ID N°: 96) se aplicaron a la dieta del insecto a una concentración de diez partes por millón (30 microlitros de disolución que contiene una muestra de ARN bicatenario ajustada a una concentración apropiada se añadió a pocillos de placas de microtítulo que contenían 200 microlitros de dieta del insecto por pocillo). Se usaron un total de dieciocho pocillos para cada muestra. Se añadió una única larva de primer estadio a cada pocillo después de que las muestras de ARN se hubieran difundido en la dieta. Los bioensayos se incubaron como se indica anteriormente durante 13 días y se monitorizaron diariamente para morbilidad y mortalidad. Una proteína cristalina insecticida Cry3Bb1 de variante de secuencia de aminoácidos designada proteína insecticida 11231 por English y col. (patente de EE.UU. n° 6.642.030) se usó como control positivo para observar la bioactividad insecticida específica para la plaga del gusano de la raíz. Cry3Bb se aplicó a la dieta como se expone en English y col., excepto que la concentración de Cry3Bb en la dieta se ajustó para ser 200-300 partes por millón. Una muestra de control separada que se trató solo con tampón o agua también se incluyó en el ensayo. Una muestra de control de ARN bicatenario y una muestra de control de ARN interferente pequeño producida a partir de muestras de control de ARN bicatenario también se incluyeron como controles negativos adicionales (kit de ARNi MEGAscript®, AMBION, Austin, Texas).

Una evaluación inicial usando moléculas de ARN bicatenario derivadas de estas diez secuencias indicó que las larvas que se dejó que se alimentaran con dieta que contenía ARN bicatenario correspondiente a un homólogo de V-ATPasa de 40 kDa (SEC ID N°: 35), un homólogo de CHD3 (SEC ID N°: 7) y un homólogo de beta-tubulina (SEC ID N°: 31) presentaron mortalidad significativa en comparación con los controles. Basándose en estos resultados, se realizaron bioensayos adicionales para probar si partículas de ARN bicatenario interferente pequeño serían o no más eficaces que las moléculas de ARN bicatenario de longitud completa.

Una secuencia homóloga de alfa-tubulina

Células eucariotas generalmente utilizan elementos estructurales citoesqueléticos que son importantes, no solo como andamiaje mecánico, sino también en soportar la forma de la célula. Microfilamentos semiflexibles hacen las células móviles, las ayudan a dividirse en la mitosis (citocinesis) y, en animales vertebrados e invertebrados, son responsables de la contracción muscular. Los microtúbulos relativamente rígidos que están constituidos por proteínas alfa y beta-tubulina desempeñan una función importante actuando de un tipo de autovía para el transporte de vesículas y orgánulos y en la separación de cromosomas durante la mitosis (cariocinesis). Los filamentos intermedios flexibles proporcionan al menos resistencia adicional a la estructura celular global. También se sabe que el citoesqueleto participa en la señalización a través del citoplasma de células. Teniendo en cuenta estas funciones, se cree que cualquier alteración del citoesqueleto, o incluso los sutiles cambios de su integridad, puede producir consecuencias patológicas a una célula.

Se identificó al menos una secuencia de la biblioteca de ADNc de CRW que se predijo que codificaba una secuencia de aminoácidos que presentaba homología con una proteína designada en el presente documento alfa-tubulina, y más específicamente denominada en el presente documento SEC ID N°: 163 como se expone en el listado de secuencias. Se creyó que una traducción de la secuencia de aminoácidos de la secuencia como se expone en SEC ID N°: 163 codificaba una proteína alfa-tubulina o fragmento de la misma. SEC ID N°: 163 sirvió de base para construir una secuencia que se predice que forma un ARN bicatenario cuando se expresa en *E. coli* de un promotor T7 o en una planta de un promotor funcional de planta. Una secuencia que sirve de base para tal secuencia codificante de ARN bicatenario es SEC ID N°: 97 como se expone en el listado de secuencias desde la posición de nucleótido 58 a la posición de nucleótido 1010. Esta secuencia puede expresarse como una molécula de ARN y purificarse y probarse en ensayos de alimentación *in vitro* para determinar la inhibición del gusano de la raíz del maíz.

Se introdujo un promotor de ARN polimerasa T7 en la dirección 5' de una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 97 desde la posición de nucleótido 58 a la posición de nucleótido 1010, y se produjo ARN a partir de esta construcción (pIC17527). Tal ARN se probó por triplicado en un ensayo de alimentación *in vitro* contra gusanos de la raíz del maíz contra un control positivo de beta-tubulina (descrita anteriormente en este documento), 200 ppm de Cry3Bb y un control sin tratar, y se determinó la mortalidad media. Las muestras de control sin tratar presentaron menos del 3-5% de mortalidad, mientras que todas las otras muestras de prueba presentaron del 20 al 55% de mortalidad. Las muestras de Cry3Bb presentaron del 20 al 36% de mortalidad, mientras que las muestras de pIC17527 (a 15 ppm) presentaron del 38 al 45% de mortalidad. Las muestras de D8 (beta tubulina como se expone en el presente documento anteriormente), también a 15 ppm, presentaron del 38 al 52% de mortalidad. Basándose en estos resultados, la construcción de alfa-tubulina se puso bajo el control de un promotor funcional de planta, usado para transformar plantas de maíz, y los eventos de transformación que se produjeron a partir de la transformación se probaron para su capacidad para resistir a la infestación por gusano de la raíz del maíz.

Raíces de plantas de maíz R0 se transformaron con una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 97. Brevemente, la secuencia que codifica una construcción de ARNb en SEC ID N°: 97 como se ha descrito anteriormente se ligó en el extremo 5' a una secuencia que consistió en el promotor e35S operativamente ligado a un intrón hsp70 de maíz

y en el extremo 3' a una secuencia de terminación de la transcripción y de poliadenilación NOS3'. Este casete de expresión se colocó en la dirección 3' de un casete de selección de glifosato. Estos casetes ligados se pusieron entonces en un vector funcional de transformación de planta de *Agrobacterium tumefaciens* y el nuevo vector se designó pMON72829 (la construcción de ARNb de alfa-tubulina), se usó para transformar tejido de maíz a tolerancia a glifosato, y se seleccionaron eventos y se transfirieron a tierra. Raíces de la planta R0 se alimentaron a larvas del gusano de la raíz del maíz occidental (WCR, *Diabrotica virgifera*). Las raíces de maíz transgénico se pasaron a placas de Petri con medio MS0D que contenía antibióticos y glifosato para la selección *in vitro*. Dos larvas de WCR se infestaron por raíz en cada placa con un pincel de punta fina. Las placas se taparon con Parafilm para prevenir que las larvas se escaparan. Los ensayos se colocaron en una estufa de incubación Percival a 27 °C, 60% de HR, en completa oscuridad. Se monitorizaron la contaminación y la calidad de las larvas. Después de seis días alimentándose de tejido de raíz, las larvas se transfirieron a dieta de WCR en una placa de 96 pocillos. Se dejó que las larvas se alimentaran de la dieta durante ocho días haciendo el ensayo completo durante catorce días. Se registraron la masa de larvas y la supervivencia para análisis. Se realizó un análisis unilateral en los datos de masa de larvas y una prueba de Dunnett para buscar significancia estadística en comparación con LH244, un control negativo sin transformar. Las larvas de WCR estaban significativamente raquílicas ( $\alpha = 0,05$ ) después de alimentarse de dos eventos, ZM\_S125922 y ZM\_S125938, y se compararon con el crecimiento de larvas alimentadas con plantas de control negativo ( $p < 0,02$ ). La alimentación de larvas de plantas de control negativo presentó una masa media de las larvas de 0,6 a 0,8 mg, mientras que la alimentación de larvas de las raíces transgénicas presentó una masa media de las larvas de 0,1 a 0,2 mg.

Las plantas de maíz transgénicas (R0) generadas usando pMON72829 se plantaron en macetas de 10 pulgadas que contenían tierra Metromix después de alcanzar un tamaño apropiado. Cuando las plantas alcanzaron el estadio de crecimiento V4, aproximadamente 1000 huevos de gusano de la raíz del maíz occidental (WCR, *Diabrotica virgifera*) se infestaron en la zona de la raíz. Maíz no transgénico del mismo genotipo se infestó en un estadio de crecimiento similar para servir de control negativo. Los huevos se incubaron previamente de forma que la eclosión se produjera en el plazo de 24 horas desde la infestación. Se dejó que las larvas se alimentaran de los sistemas radiculares durante 3 semanas. Las plantas se sacaron de la tierra y se lavaron de manera que las raíces pudieran evaluarse para la alimentación de larvas. El daño a la raíz se evaluó usando una Escala de Daños de Nodos (NIS) para puntuar el nivel de daño en la que 0 indica sin daño, un 1 indica que un nodo de raíces se podó hasta 3,85 cm, un 2 indica que se podaron 2 nodos, mientras que un 3 indica que se podaron 3 nodos. Debido a que las plantas que se usaron para la evaluación estuvieron directamente fuera del cultivo de tejido después de la transformación y debido a que los eventos de transformación son únicos, solo se evaluó una única planta por evento en este momento y no están disponibles estadísticas. Todas las plantas en el ensayo presentaron síntomas de alimentación de larvas que indica que se obtuvo una infestación satisfactoria. Las raíces de plantas de control negativo se dañaron de moderadamente a gravemente promediando 1,9 en la Escala de Daños de Nodos. Se probaron plantas individuales de ocho eventos transgénicos diferentes. Las raíces de tres de estas plantas transgénicas proporcionaron excelente control de alimentación de larvas, promediando 0,2 o menos en la Escala de Daños de Nodos. Las raíces de dos de las plantas transgénicas presentaron daño por alimentación moderado, y otras tres plantas transgénicas no presentaron control de alimentación por larvas. Estos datos indicaron que la secuencia de nucleótidos doble que codifica una secuencia de ARN que puede formarse en un ARNb es completamente capaz de proporcionar protección de infestación de plagas de gusanos de la raíz cuando se expresan en una planta transgénica y que la planta se proporciona en la dieta de la plaga del gusano de la raíz.

Un explicación para la falta de mortalidad observable coherente u otros efectos con las secuencias seleccionadas para supresión génica que incluyen EF1alfa, subunidad del proteasoma 26S, y diversas otras secuencias de ADNc, podría ser que, para estos genes, se expresan homólogos presentes dentro de la población de genes que codifican proteínas que tienen funciones similares, pero presentan diferencias de secuencia suficientes de manera que la ruta de RNAi no actúa suprimiendo el homólogo usando las secuencias seleccionadas para supresión.

## Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la significativa inhibición de plagas obtenida alimentando a una plaga de invertebrados una dieta que contiene secuencias de ARN bicatenario derivadas de esa plaga.

Se preparó dieta artificial suficiente para criar larvas de gusano de la raíz del maíz aplicando muestras de secuencias de ARN bicatenario derivadas de seis secuencias de la biblioteca de ADNc de gusano de la raíz del maíz diferentes. Se dejó que las larvas de gusano de la raíz del maíz se alimentaran de la dieta durante varios días y se monitorizaron la mortalidad, morbilidad y atrofia en comparación con gusanos de la raíz a los que solo se les dejó alimentarse de dieta de control. Las secuencias de nucleótidos que se usaron en la dieta se derivaron de secuencias como se exponen en SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 47, SEC ID N°: 52, SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 31, cada una correspondiente a secuencias de nucleótidos derivadas de una biblioteca de ADNc de gusano de la raíz del maíz, cuya traducción deducida de la secuencia de aminoácidos se corresponde respectivamente con proteínas anotadas por un homólogo de V-ATPasa de 40 kDa, un homólogo de EF1 $\alpha$ , un homólogo de la subunidad del proteasoma 26S, un homólogo de epóxido hidroxilasa de la hormona juvenil, un homólogo de CHD3 y un homólogo de  $\beta$ -tubulina.

ARN bicatenarios (ARNb) correspondientes a estas secuencias se produjeron como se indica anteriormente. Se generaron ARNip por escisión de los ARNb correspondientes usando la enzima ARNsa III, que es conocida por escindir ARNb en fragmentos de ARNb de 12-15 pb que contienen nucleótidos protuberantes en 3' de 2 a 3 nucleótidos, y fosfato en 5' y extremos de hidroxilo en 3'. Era de esperar que los ARNip producidos de esta forma presentaran las mismas propiedades que los ARNip que se hubieran producido por la enzima Dicer que participa en la ruta de ARNi eucariota.

Los ARNb y ARNip se muestrearon sobre la dieta de CRW como se indica anteriormente a 0,15 ppm. Se probaron 12 larvas de gusano de la raíz del maíz individuales por separado contra cada muestra de ARNb o ARNip como se indica anteriormente y los resultados se puntuaron después de 13 días.

Se observó una reducción significativa en la masa de larvas ( $p < 0,05$ ) para larvas que se alimentaron con dieta que contenía 0,15 ppm de secuencias de ARNb como se expone en SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 52, SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 31 en comparación con el control sin tratar (UTC). El ARNip correspondiente a secuencias como se exponen en SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 47 y SEC ID N°: 7 también proporcionó una reducción significativa en la masa de larvas ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, el tamaño de muestra de larvas fue insuficiente para establecer con certeza que las moléculas de ARNb o ARNip que produjeron la mayor disminución en la masa de larvas en comparación con los controles fuera un resultado de variación al azar o claramente un resultado basado en la inhibición mediada por ARN bicatenario de alguna función biológica dentro de las larvas de gusano de la raíz. Por tanto, basándose en estos resultados, las secuencias de ARN correspondientes a SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 31 se volvieron a evaluar con un mayor tamaño de muestra de larvas.

Las muestras de ARNb o ARNip se aplicaron a cada uno de 72 pocillos para cada una de las cuatro secuencias de ARN en la evaluación. Cada pocillo se cargó con 0,15 ppm de ARNb o ARNip como se indica anteriormente aplicando un volumen de 30 microlitros que contenía el ARN a la superficie de la dieta y permitiendo que la muestra se infundiera y la superficie de la dieta se secase. Se añadió una única larva a cada pocillo y se incubó durante trece días. Se evaluaron la mortalidad y morbilidad de las larvas, y se determinó la masa de larvas supervivientes. Los resultados del bioensayo se muestran en la Tabla 1.

25

Tabla 1. Resultados del bioensayo

ARN	% de mortalidad	Masa (mg)	STE
<b>Resultados del bioensayo de ARNb</b>			
SEC ID N°: 35	62,25	0,42	0,12
SEC ID N°: 39	50,5	0,39	0,05
SEC ID N°: 7	47,67	0,37	0,05
SEC ID N°: 31	92,24	0,27	0,05
Control de ARNb <sup>1</sup>	21,08	0,58	0,08
Cry3Bb <sup>2</sup>	42,08	0,21	0,03
UTC	5,58	1,24	0,33
<b>Resultados del bioensayo de ARNip</b>			
SEC ID N°: 35	21,11	0,45	0,06
SEC ID N°: 35	21,39	1,31	0,16
SEC ID N°: 7	15,83	0,73	0,09
SEC ID N°: 31	20,00	0,39	0,07
Control de ARNb <sup>1</sup>	6,52	1,10	0,16
Cry3Bb <sup>2</sup>	27,78	0,49	0,05
UTC	9,45	1,25	0,18

(continuación)

---

Todas las muestras de ARNip a 0,15 ppm por pocillo

UTC – Tris HCl 10 mM a pH 7,5

STE – Error estándar

1- ARNb de fago  $\lambda$ , EPICENTER TECHNOLOGIES, Madison, Wisconsin en bioensayo de ARNb; kit de ARNi MEGAscript®, AMBION, Austin, Texas en bioensayo de ARNip

2- Variante de Cry3Bb 11231 a 300 ppm en bioensayo de ARNb, 200 ppm en bioensayo de ARNip

---

5 Todas las muestras se compararon entre sí usando el procedimiento de HSD de Tukey en vez de con cualquier control individual. Se observó una significativa atrofia de las larvas para cada ARNb o ARNip probado como se determina por la reducción de la masa promedio de larvas supervivientes en comparación con el control sin tratar. Y, lo que es más importante, las muestras de ARN interferente pequeño bicatenario demostraron una capacidad para producir mortalidad y morbilidad (basándose en masa de larvas reducida) a un nivel que era al menos tan eficaz como la variante de Cry3Bb de muestra de control positivo 11231. Estos resultados sugieren que cualquier molécula de ARN bicatenario derivada de una secuencia de ARN mensajero presente en las células de gusano de la raíz del maíz podría ser eficaz cuando se proporcionara a gusanos de la raíz en su dieta para inhibir la infestación de plagas de gusanos de la raíz de una especie de planta.

### Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra secuencias de nucleótidos para la expresión en una célula de planta, y el efecto de proporcionar tales secuencias de nucleótidos en la dieta de un gusano de la raíz del maíz.

15 Se usó una secuencia codificante de CHD3 derivada de un biblioteca de ADNc de gusano de la raíz del maíz para construir una secuencia de nucleótidos que codificaba un ARN bicatenario estabilizado. Una secuencia de ADNc como se expone en SEC ID N°: 171 que codifica una parte de un ortólogo o un homólogo de una secuencia de aminoácidos de CHD3 se usó para construir un par de cebadores para su uso en una reacción de amplificación térmica usando ADN molde genómico de gusano de la raíz del maíz. El par de cebadores como se expone en SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6

20 permitió la amplificación de un amplicón de genoma bicatenario, una hebra del cual presentó la secuencia como se expone en SEC ID N°: 7. Se produjeron tres segmentos de secuencias de nucleótidos a partir de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 7. Un primer segmento de nucleótido (SEC ID N°: 174) se produjo usando una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 7 como molde en una reacción de amplificación térmica junto con el par de cebadores de amplificación térmica que presentan las secuencias como se exponen en SEC ID N°: 8 y SEC

25 ID N°: 9. Un segundo segmento de nucleótido (SEC ID N°: 13) se produjo usando una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 7 como molde en una reacción de amplificación térmica junto con el par de cebadores de la amplificación térmica que presentan las secuencias como se exponen en SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 12. Un tercer segmento de nucleótido (SEC ID N°: 16) se produjo usando una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 7 como molde en una reacción de amplificación térmica junto con el par de cebadores de la amplificación térmica que

30 presentan las secuencias como se exponen en SEC ID N°: 14 y SEC ID N°: 15. El extremo 3' de una de las hebras del primer segmento es complementaria al extremo 3' de una de las hebras del segundo segmento de manera que en una reacción de amplificación térmica que contiene ambos de estos segmentos, estos extremos complementarios se hibridan y permiten la extensión mediada por polimerasa de ambas hebras desde sus extremos 3' respectivos. El extremo 3' de la otra hebra del segundo segmento es complementaria al extremo 3' de una de las hebras del tercer segmento, de manera

35 que en una reacción de amplificación térmica que contiene ambos de estos segmentos, estos extremos complementarios se hibridan y permiten la extensión mediada por polimerasa de ambas hebras desde sus extremos 3' respectivos. En una reacción de amplificación térmica que contiene los tres segmentos y sus secuencias complementarias, es decir, el primer, el segundo y el tercer segmento, junto con secuencias de cebadores de amplificación térmica como se exponen en SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 15, se produce una nueva secuencia como se expone en SEC ID N°: 17, que cuando se pone bajo

40 el control de un promotor que funciona en plantas, puede producir una secuencia de ARN de nucleótidos sustancialmente idéntica a la secuencia como se expone en SEC ID N°: 17, excepto que están presentes residuos de uridina en lugar de residuos de timidina. Esta secuencia de ARN de nucleótidos pueden formarse en una molécula de ARN estabilizado en virtud de la complementariedad inversa del tercer segmento al primer segmento, en el que la porción de SEC ID N°: 17 correspondiente al tercer segmento desde la posición de nucleótido 303 a la posición de nucleótido 473 se hibrida con la

45 porción de SEC ID N°: 17 correspondiente al primer segmento desde la posición de nucleótido 1 a la posición de nucleótido 171, y el primer y el tercer segmentos se ligan por un segundo segmento de la secuencia de nucleótidos, que en este ejemplo se representa por la porción de SEC ID N°: 17 correspondiente al segundo segmento desde la posición de

nucleótido 172 a la posición de nucleótido 302. La expresión de una secuencia de nucleótidos correspondiente a SEC ID N°: 17 en células de planta produce la síntesis de una molécula de ARN estabilizado. Células de planta que transcriben una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 17 en una secuencia de ARN pueden proporcionarse en la dieta de un gusano de la raíz del maíz. Un gusano de la raíz del maíz que se alimenta de tales células de planta deja de alimentarse, se previene que se desarrolle en un escarabajo adulto, se previene que críe, muere o sufre cualquiera o todos de estos efectos como resultado de la inhibición de la síntesis de proteínas homólogas de CHD3.

Se usó una secuencia codificante de  $\beta$ -tubulina derivada de una biblioteca de ADNc de gusano de la raíz del maíz para construir una secuencia de nucleótidos que codifica un ARN bicatenario estabilizado. Se usó una secuencia de ADNc como se expone en SEC ID N°: 18 que codifica una parte de un ortólogo o un homólogo de una secuencia de aminoácidos de  $\beta$ -tubulina para construir un par de cebadores para su uso en una reacción de amplificación térmica usando ADN molde genómico de gusano de la raíz del maíz. El par de cebadores como se expone en SEC ID N°: 19 y SEC ID N°: 20 permitió la amplificación de un amplicón de genoma bicatenario, una hebra del cual presentó la secuencia como se expone en SEC ID N°: 21. Se produjeron tres segmentos de secuencias de nucleótidos a partir de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 21. Un primer segmento de nucleótido (SEC ID N°: 173) se produjo usando una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 21 como molde en una reacción de amplificación térmica junto con el par de cebadores de amplificación térmica que presentan las secuencias como se exponen en SEC ID N°: 22 y SEC ID N°: 23. Un segundo segmento de nucleótido (SEC ID N°: 27) se produjo usando una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 21 como molde en una reacción de amplificación térmica junto con el par de cebadores de amplificación térmica que presentan las secuencias como se exponen en SEC ID N°: 25 y SEC ID N°: 26. Un tercer segmento de nucleótido (SEC ID N°: 36) se produjo usando una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 21 como molde en una reacción de amplificación térmica junto con el par de cebadores de amplificación térmica que presentan las secuencias como se exponen en SEC ID N°: 28 y SEC ID N°: 29. El extremo 3' de una de las hebras del primer segmento es complementario al extremo 3' de una de las hebras del segundo segmento de manera que en una reacción de amplificación térmica que contiene ambos de estos segmentos, estos extremos complementarios se hibridan y permiten la extensión mediada por polimerasa de ambas hebras a partir de sus extremos 3' respectivos. El extremo 3' de la otra hebra del segundo segmento es complementario al extremo 3' de una de las hebras del tercer segmento, de manera que en una reacción de amplificación térmica que contiene ambos de estos segmentos, estos extremos complementarios se hibridan y permiten la extensión mediada por polimerasa de ambas hebras a partir de sus extremos 3' respectivos. En una reacción de amplificación térmica que contiene los tres segmentos y sus secuencias complementarias, es decir, el primer, el segundo y el tercer segmento, junto con secuencias de cebadores de amplificación térmica como se exponen en SEC ID N°: 22 y SEC ID N°: 29, se produce una nueva secuencia como se expone en SEC ID N°: 31, que cuando se pone bajo el control de un promotor que funciona en plantas, puede producir una secuencia de ARN de nucleótidos sustancialmente idéntica a la secuencia como se expone en SEC ID N°: 31, excepto que están presentes residuos de uridina en lugar de residuos de timidina. Esta secuencia de ARN de nucleótidos puede formarse en una molécula de ARN estabilizado en virtud de la complementariedad inversa del tercer segmento al primer segmento, en el que la porción de SEC ID N°: 31 correspondiente al tercer segmento desde la posición de nucleótido 358 a la posición de nucleótido 577 se hibrida con la porción de SEC ID N°: 31 correspondiente al primer segmento desde la posición de nucleótido 31 a la posición de nucleótido 250, y el primer y tercer segmentos se ligan por un segundo segmento de secuencias de nucleótidos, que en este ejemplo se representa una parte de SEC ID N°: 31 correspondiente al segundo segmento desde la posición de nucleótido 251 a la posición de nucleótido 357. La expresión de una secuencia de nucleótidos correspondiente a SEC ID N°: 31 en células de planta produce la síntesis de una molécula de ARN estabilizado. Células de planta que transcriben una secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 31 en una secuencia de ARN pueden proporcionarse en la dieta de un gusano de la raíz del maíz. Un gusano de la raíz del maíz que se alimenta de tales células de planta deja de alimentarse, se previene que se desarrolle en un escarabajo adulto, se previene que críe, muere o sufre cualquiera o todos de estos efectos como resultado de la inhibición de la síntesis de proteínas de  $\beta$ -tubulina.

#### Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra los efectos sinérgicos de proporcionar en la dieta de una plaga de invertebrados una o más composiciones pesticidamente eficaces junto con una o más secuencias de ARN bicatenario derivadas de la plaga de invertebrados, habiendo demostrado previamente la una o más secuencias de ARNb un efecto pesticida cuando se proporcionan en la dieta de la plaga.

Como se indica en el Ejemplo 3, proporcionar en la dieta de una plaga de invertebrados una molécula de ARN bicatenario derivada de esa plaga produce la inhibición de una o más funciones biológicas en la plaga y, por tanto, funciones para lograr un efecto pesticida, produciendo la mortalidad de la plaga o alguna otra característica medible que reduce la capacidad de la plaga para infestar un entorno o huésped particular. La adición de uno o varios de otros agentes pesticidas, cada uno diferente entre sí y funcionando cada uno para lograr su efecto pesticida por un medio diferente de la forma en la que funciona el ARNb para lograr su efecto pesticida, puede producir que se consiga una mejora en el nivel de control de plagas y disminuiría adicionalmente la probabilidad que la plaga desarrollara resistencia a uno cualquiera o

más de los agentes pesticidas o ARNb cuando se usa solo para lograr inhibición de la plaga.

Para probar esto, se deja que las larvas de CRW se alimenten de dieta en la que se incorporan cantidades variables de un proteína inhibidora de gusano de la raíz Cry3Bb y una cantidad fija de un ARN bicatenario formulado anteriormente como se expone en el Ejemplo 2 ó 3, tal como un ARNb correspondiente a SEC ID N°: 17 o SEC ID N°: 31. Se observa un efecto de inhibición de la plaga sinérgico. Como se expone en el Ejemplo 2 y 3, se usó una cantidad de DL50 de una Cry3Bb de variante para lograr el 50% de la mortalidad de larvas de insecto con una reducción coordinada en la salud de las larvas supervivientes como se determina con los pesos de larvas reducidos en comparación con controles negativos. El reducir la cantidad de proteína insecticida en la dieta produce una reducción coordinada en la tasa de mortalidad, y un aumento en los pesos de larvas supervivientes medios. La adición de ARNb correspondiente a tanto SEC ID N°: 31 como a SEC ID N°: 17 produce mortalidad casi completa a cada concentración de Cry3Bb, y una disminución sustancial en el peso medio de cualquier superviviente. Esto sugiere un efecto sinérgico. La sinergia puede lograrse mediante la alteración en el intestino medio de las larvas como resultado de la introducción de cualquier cantidad de Cry3Bb, que se ha mostrado que introduce poros en la membrana del intestino medio. Los poros pueden permitir que un mayor nivel de especies de ARN bicatenario penetren en las células o incluso en la hemolinfa, produciendo un administración eficaz de las especies de ARNb en las larvas, y produciendo así una reducción más eficaz en la supresión del ARNm diana. Combinaciones particulares de composiciones formadoras de poros junto con composiciones de ARN bicatenario producen un efecto pesticida potenciado y sinérgico o debido a que el ARNb es ahora más capaz de distribuirse a través de la hemolinfa y ejercer efectos sobre células y tejidos remotos del intestino de la plaga. Composiciones formadoras de poros particulares incluyen, pero puede no se limitan a, proteínas de toxinas insecticidas derivadas de *B. thuringiensis* y especies relacionadas, tanto si se demuestra como si no que son insecticidas para un insecto particular, y adicionalmente pueden incluir, pero no se limitan a, dominios formadores de poros de tales toxinas. Tales composiciones formadoras de poros también pueden incluir una o más de tales toxinas o dominios formadores de poros o combinaciones de los mismos, cada uno diferente del otro, presentando cada uno un modo de acción diferente como se determina por cada toxina o propiedades formadoras de canales de los dominios que incluyen cinética de la formación de canales de iones, tamaños de estados de conductancia, conductancia total de la membrana, especificidad de iones y propiedades de regulación de canales de iones. Las combinaciones de tales composiciones formadoras de poros junto con moléculas de ARNb específicas para la supresión de uno o más genes en una especie de coleóptero se contemplan específicamente en el presente documento.

### Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra que los fragmentos de secuencias de nucleótidos de la V-ATPasa, cuando se proporcionan en la forma de ARN bicatenario en la dieta de una especie de CRW, son útiles para controlar la plaga de insectos.

La secuencia como se expone en SEC ID N°: 104 es un clon de ADNc que representa 1870 nucleótidos de un ARNm de 2400 nucleótidos que codifica una proteína que presenta identidad sustancial de secuencias con una ATPasa vacuolar de *Drosophila melanogaster* (68 kd, subunidad 2). Este clon de ADNc se secuenció completamente en ambas hebras usando cebadores diseñados a partir de los datos de la secuencia inicial. Estos cebadores de secuenciación se enumeran como SEC ID N°: 105 a SEC ID N°: 120. SEC ID N°: 121 y SEC ID N°: 122 son secuencias de los cebadores usadas para producir una copia de SEC ID N°: 104 a partir del ADNc en el vector de clonación pSPORT (Invitrogen). Cada cebador contuvo una secuencia del promotor T7 de 20 nucleótidos de las posiciones de nucleótidos 1 - 20. Los nucleótidos 21-44 expuestos en SEC ID N°: 121 y los nucleótidos 21-45 de SEC ID N°: 122 se corresponden con secuencias dentro del vector pSPORT que flanquean el ADNc insertado. Estos cebadores permiten la amplificación de un molde de ADN que contiene el fragmento de ADNc flanqueado en cualquier extremo con promotores T7, permitiendo la producción *in vitro* de ARN bicatenario con una ARN polimerasa T7. Cuando el ARN bicatenario derivado de SEC ID N°: 104 se incluyó en la dieta de CRW se observó un 80% de mortalidad.

Se probaron seis regiones diferentes de SEC ID N°: 104 usando los siguientes conjuntos de cebadores de amplificación: SEC ID N°: 123 y SEC ID N°: 124, correspondientes a los nucleótidos 1 a 291 (denominados sección n° 1, 271 pares de bases) de SEC ID N°: 1; SEC ID N°: 125 y SEC ID N°: 126 correspondientes a los nucleótidos 292 a 548 (denominados sección n° 2, 260 pares de bases); SEC ID N°: 127 y SEC ID N°: 128 correspondientes a 549 a 830 (denominado sección n° 3, 271 pares de bases); SEC ID N°: 129 y SEC ID N°: 130 correspondientes a los nucleótidos 840 a 1345 (denominados sección n° 4, 505 pares de bases); SEC ID N°: 131 y SEC ID N°: 132 correspondientes a los nucleótidos 1360 a 1621 (denominados sección n° 5, 261 pares de bases); SEC ID N°: 133 y SEC ID N°: 136 correspondientes a los nucleótidos 1540 a 1870 (denominados sección n° 6, 278 pares de bases). Obsérvese que la sección 5 y 6 se solaparon aproximadamente 80 pares de bases. Cuando estas 6 secciones se incorporaron por separado en la dieta de CRW, las secciones n° 1, n° 2, n° 3 y n° 4 mostraron mortalidad de CRW que oscilaba del 94% al 100%. La sección n° 5 y n° 6 no mostraron mortalidad de CRW por encima de la referencia observada en los controles sin tratar. La secuencia representada por la sección n° 1 se subdividió adicionalmente en 3 secciones más pequeñas, representándose cada una de estas tres secciones más pequeñas por al menos de 150 a 180 nucleótidos contiguos dentro de la sección n° 1, de manera que la primera subsección en la sección n° 1 se solapó con la segunda subsección en la sección n° 1, y la tercera subsección en la sección n° 1 se solapó con la segunda subsección. Cada una de estas subsecciones se probó por

separado en el bioensayo de CRW. Se observó mortalidad entre el 80 y el 90% usando estas tres secuencias más cortas.

Un segundo medio para probar la bioactividad de moléculas de ARNb derivadas de genes de CRW es construir una molécula de ARN autocomplementaria. Combinando la misma secuencia de ADN en la orientación inversa con el promotor de ARN polimerasa T7 puede sintetizarse una única molécula de ARN que es autocomplementaria. Una molécula de ARN tal se construyó combinando los nucleótidos 1 a 345 con los nucleótidos 50 a 325 de la secuencia de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 104. La secuencia resultante es como se expone en SEC ID N°: 137 y se designó pIC17527. pIC17527 se clonó en pTOPT2.1 (Invitrogen). Usando el promotor T7 en el vector pTOPO2.1 se produjo un ARNb de aproximadamente 500 pares de bases de nucleótidos y se incorporó en la dieta de CRW. La mortalidad resultante estuvo entre el 80% y el 100%.

## 10 Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la toxicidad oral de ARNb hacia larvas del escarabajo de la patata de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*.

Se aisló ARN total de larvas del escarabajo de la patata de Colorado (CPB), *Leptinotarsa decemlineata*, usando el kit *mirVana* de Ambion (catálogo n° 1560) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX). Para cada preparación se usaron larvas de CPB que ocupaban aproximadamente 200 µl de volumen en un tubo Microfuge. Se usaron cinco microgramos de ARN total para preparar ADNc usando el sistema de RT-PCR Thermoscript™ de Invitrogen (n° de catálogo 11146) y procedimientos recomendados para la síntesis de ADNc mediada por cebadores aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este ADNc se usó como molde para la amplificación de secuencias ortólogas de la subunidad 2 de V-ATPasa A usando ADN polimerasa Taq y los cebadores de oligonucleótidos pr550 (SEC ID N°: 160) y pr552 (SEC ID N°: 161). Estos cebadores se diseñaron alineando las secuencias de nucleótidos para los ortólogos de V-ATPasa A más próximos de *Manduca sexta* (SEC ID N°: 151), *Aedes aegypti* (SEC ID N°: 152), *Drosophila melanogaster* (SEC ID N°: 153) y *Diabrotica virgifera* (WCR) y seleccionando regiones de degeneración mínima. El cebador pr550 se corresponde con los nucleótidos 230-252 en la secuencia del gen de *M. sexta* mientras que el cebador pr552 se corresponde con los nucleótidos 1354-1331 en la secuencia del gen de *M. sexta*.

25 La amplificación se logró usando un procedimiento de amplificación con rampa decreciente de temperatura con los siguientes parámetros de ciclos:

Etapa 1. 94 °C, 2 min;

Etapa 2. 94 °C, 30 s;

Etapa 3. 50 °C, 2 min;

30 Etapa 4. 72 °C, 2 min

(35 ciclos para las etapas 2-4, con una etapa de reducción de -0,3 °C por ciclo para la etapa 3);

Etapa 5. 72 °C, 10 min; y

Etapa 6. 4 °C.

35 El fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kb amplificado a partir del ADNc se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) dando el plásmido recombinante pIC17105. La secuencia de nucleótidos del inserto clonado (SEC ID N°: 144) comparte solo el 82% de identidad de secuencias de nucleótidos con la secuencia ortóloga de la subunidad 2 de V-ATPasa A del gusano de la raíz del maíz occidental, *Diabrotica virgifera*, sin embargo, las secuencias de aminoácidos deducidas para las proteínas de V-ATPasa A codificadas comparten el 97% de identidad de secuencias.

40 La secuencia ortóloga de V-ATPasa A en el plásmido pIC17105 se amplificó usando los cebadores pr568 (SEC ID N°: 162) y pr569 (SEC ID N°: 163), diseñados como cebadores “universales” para generar moldes de ADN con secuencias de promotores de polimerasa T7 flanqueantes de clones pCR2.1-TOPO. El ADN amplificado sirvió de molde para la síntesis de ARNb usando el kit MEGascript™ de Ambion (n° de catálogo 1626) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX). El ARNb purificado derivado de la secuencia ortóloga de V-ATPasa A de *L. decemlineata* se alimentó a larvas de *L. decemlineata* en un ensayo de alimentación de insectos.

45 La dieta de CPB consiste en 13,2 g/l de agar (Serva 11393), 140,3 g/l de premezcla Bio-Serve (F9380B), 5 ml/l de KOH (18,3% peso/peso) y 1,25 ml/l de formalina (37%). La dieta se dispensó en alícuotas de 200 µl sobre placas de 96 pocillos y se secaron brevemente antes de la aplicación de la muestra. Veinte l de muestra de prueba se aplicaron por pocillo, sirviendo agua estéril de comprobación sin tratar (UTC). Las placas se dejaron secar antes de añadir larvas de insecto. Se añadió una larva de CPB neonata por pocillo con un pincel fino. Las placas se taparon con Mylar y se ventilaron usando un afilador para insectos. Se probaron cuarenta larvas por tratamiento. Las placas de bioensayo se incubaron a 27 °C, 60%

50

de HR, en completa oscuridad durante 10 - 12 días. Las placas se puntuaron para atrofia y mortalidad de larvas. Los datos se analizaron usando el software estadístico JMP 4 (SAS Institute, Cary, N. C., EE.UU.).

Tabla 2. Toxicidad oral de ARNb para larvas de CPB

Tratamiento	% de mortalidad	Desv estándar	EEM	CI del 95%
Comprobación sin tratamiento	8,33	10,21	4,17	-2,38-19,04
ARNb de V-ATPasa A	87,5	10,83	3,61	79,18-95,82

- 5 Basándose en los datos de bioensayo de toxicidad oral usando un ARNb de V-ATPasa específico para CPB, la infestación por CPB de plantas puede controlarse proporcionando en la dieta de la plaga una célula de planta que expresa una o más secuencias de ARNb específicas para la supresión de uno o más genes en una plaga de CPB.

### Ejemplo 7

- 10 Este ejemplo ilustra los resultados de bioensayos de diversas larvas de lepidópteros en dieta artificial usando ARNb específico para insecto.

- 15 Se aisló ARN total de larvas del 2<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> estadio de *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon* y *Ostrinia nubilalis* usando el kit *miRVana* de Ambion (nº de catálogo 1560) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX). Para cada preparación se usaron larvas de CPB que ocupaban aproximadamente 200 µl de volumen en un tubo Microfuge. Se usaron cinco microgramos de ARN total de cada una de las especies de lepidópteros anteriores para preparar ADNc usando el sistema de RT-PCR Thermoscript™ de Invitrogen (nº de catálogo 11146) y procedimientos recomendados para la síntesis de ADNc mediada por cebadores aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este ADNc se usó como molde para la amplificación de una o más secuencias ortólogas de la subunidad 2 de V-ATPasa A específicas para cada una de las especies de lepidópteros usando ADN polimerasa Taq y los cebadores de oligonucleótidos pr550 (SEC ID Nº: 160) y pr552 (SEC ID Nº: 161).

- 20 Estos cebadores se diseñaron alineando las secuencias de nucleótidos para los ortólogos de V-ATPasa A más próximos de *Manduca sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster* y *Diabrotica virgifera* (WCR) y seleccionando regiones de degeneración mínima. El cebador pr550 se corresponde con los nucleótidos 230-252 en la secuencia del gen de *M. sexta* mientras que el cebador pr552 se corresponde con los nucleótidos 1354-1331 en la secuencia del gen de *M. sexta*.

- 25 La amplificación se logró usando un procedimiento de amplificación con rampa decreciente de temperatura con los parámetros de ciclos como se han descrito en el Ejemplo 6. Los productos de ADN amplificado se clonaron en pCR2.1-TOPO y se secuenciaron para confirmar su identidad. Los plásmidos recombinantes que contenían las secuencias de genes ortólogos se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias ortólogas de la subunidad 2 de V-ATPasa A de lepidópteros

Plásmido	Especies de insecto	SEC ID Nº:
pIC17088	<i>Spodoptera frugiperda</i>	SEC ID Nº: 145
pIC17101	<i>Agrotis ipsilon</i>	SEC ID Nº: 146
pIC17102	<i>Helicoverpa zea</i>	SEC ID Nº: 147
pIC17103	<i>Ostrinia nubilalis</i>	SEC ID Nº: 148

- 30 Las secuencias ortólogas de V-ATPasa A en los plásmidos pIC17088, pIC17101, pIC17102 se amplificaron usando los cebadores pr555 (SEC ID Nº: 164) y pr556 (SEC ID Nº: 165), diseñados para generar fragmentos de ADN con promotores de polimerasa T7 flanqueantes y opuestos para la síntesis de ARNb *in vitro*.

- 35 Se sintetizaron ARN bicatenarios (ARNb) para las secuencias ortólogas de FAW, BCW y CEW a partir de estos moldes de ADN amplificado usando el kit MEGAscript™ de Ambion (nº de catálogo 1626) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX) y se enviaron para bioensayos de insectos a 10 ppm.

Para estos ensayos se preparó dieta de lepidópteros artificial (165 g/l de Southland Multiple Species Diet, 14,48 g/l de agar) y se dispensó a bandejas de 128 pocillos, 500 ul por pocillo. Las muestras se dispensaron sobre la dieta y se

dispusieron en una cámara de “secado” a 27 °C y 35% de humedad, en la que el exceso de agua se evapora. Una vez secado cada pocillo se infestó con una única larva neonata y se selló con un sellado de Mylar perforado. Las bandejas se incubaron durante seis a ocho días a 27 °C. Los insectos de control sin tratar habían agotado toda la dieta en sus pocillos respectivos a de seis a ocho días. Se prepararon bandejas de cincuenta pocillos con 4 ml de dieta artificial por pocillo, y todos los insectos que habían agotado o estaban a punto de agotar la dieta antes de concluir el ensayo se transfirieron a las nuevas bandejas. Estas bandejas se taparon y se devolvieron a la estufa de incubación, y entonces se evaluaron todos los bioensayos después de un total de diez a doce días.

Los resultados de estos bioensayos para la especie de insectos de lepidópteros no indican efecto significativo sobre la mortalidad de larvas o el aumento de masa con respecto a la comprobación sin tratar (comparaciones para todos los pares usando HSD de Tukey-Kramer) y se ha observado usando esta pauta de ensayo. Los efectos sobre la mortalidad de larvas o aumento de masa tampoco se observaron en bioensayos usando combinaciones de ARNb y cantidades subletales de proteínas insecticidas de Bt formadoras de poros conocidas de experimentos previos por ser tóxicas para estas plagas de lepidópteros.

### Ejemplo 8

Este ejemplo ilustra un bioensayo para determinar la toxicidad oral de ARNb hacia larvas del gorgojo de la cápsula del algodón, *Anthonomus grandis*.

Se aisló ARN total de larvas del gorgojo de la cápsula del algodón (BWV), *Anthonomus grandis*, usando el kit *mirVana* de Ambion (nº de catálogo 1560) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX). Para cada preparación se usaron larvas de BWV que ocupaban aproximadamente 200 ul de volumen en un tubo Microfuge. Se usaron cinco microgramos de ARN total para preparar ADNc usando el sistema de RT-PCR Thermoscript™ de Invitrogen (nº de catálogo 11146) y procedimientos recomendados para la síntesis de ADNc mediada por cebadores aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este ADNc se usó como molde para la amplificación de secuencias ortólogas de la subunidad 2 de V-ATPasa A usando ADN polimerasa Taq y los cebadores de oligonucleótidos pr550 (SEC ID Nº: 160) y pr552 (SEC ID Nº: 161).

Estos cebadores se diseñaron alineando las secuencias de nucleótidos para los ortólogos de V-ATPasa A más próximos de *Manduca sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster* y *Diabrotica virgifera* (WCR) y seleccionando regiones de degeneración mínima. El cebador pr550 se corresponde con los nucleótidos 230-252 en la secuencia del gen de *M. sexta* mientras que el cebador pr552 se corresponde con los nucleótidos 1354-1331 en la secuencia del gen de *M. sexta*.

La amplificación se logró usando un procedimiento de amplificación con rampa decreciente de temperatura con los parámetros de ciclos como se han descrito en el Ejemplo 6. El fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kb amplificado a partir del ADNc se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y el inserto se secuenció para confirmación. La secuencia ortóloga de V-ATPasa A (SEC ID Nº: 149) se amplificó usando los cebadores pr568 (SEC ID Nº: 162) y pr569 (SEC ID Nº: 163), diseñados como cebadores “universales” para generar moldes de ADN con secuencias de promotores de polimerasa T7 flanqueantes de clones pCR2.1-TOPO.

Se sintetizaron ARN bicatenarios (ARNb) a partir de este molde de ADN amplificado usando el kit MEGAscript™ de Ambion (nº de catálogo 1626) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX) y se enviaron para bioensayo de insectos.

Para bioensayos del gorgojo de la cápsula, *Anthonomus grandis* Boheman, se usó dieta de insecto artificial basada en agar (Bioserv™ - F9247B; Gast y Davich, 1966) por instrucciones del fabricante. Se dispensaron aproximadamente 200 ul de dieta fundida en placas de microtitulación de 96 pocillos y se dejaron enfriar y solidificar. Una muestra (20 ul) que contenía 10 ppm de ARNb correspondiente a la secuencia ortóloga de V-ATPasa A (SEC ID Nº: 149) se recubrió entonces sobre la dieta y se dejó secar. Entonces se dispensaron huevos de insecto (0-14) en 25 ul de agar al 0,1% sobre la dieta. Las placas se taparon entonces con sellados perforados (Zymark nº 72281). El ensayo se incubó a 27 °C durante de diez a doce días y se puntuó para actividad por determinación de la acumulación de excrementos. No se observaron efectos sobre la mortalidad o aumento de peso de las larvas, pero esto puede ser un resultado de la fisiología de alimentación particular del gorgojo de la cápsula. El cavado en la dieta puede disminuir significativamente la dosis de ARNb ingerido y, por tanto, reducir significativamente cualquier efecto que se observara de otro modo con una fisiología de alimentación superficial. La incorporación del ARNb en la dieta de un modo uniforme alcanzaría probablemente mortalidad significativa y aumento de masa reducido.

Pueden clonarse otras secuencias de genes diana del gorgojo de la cápsula y usarse como moldes para la síntesis *in vitro* de ARNb que pueden entonces probarse en bioensayo de insectos para evaluar su eficacia. Por ejemplo, el gen de la proteína ribosómica L19 (*rpl19*) puede usarse como molde para la síntesis de ARNb. Las secuencias de nucleótidos para los ortólogos *rpl19* de *Bombyx mori* (SEC ID Nº: 154), *Drosophila melanogaster* (SEC ID Nº: 155), *Anopheles gambiae* (SEC ID Nº: 156) y *Diabrotica virgifera* (SEC ID Nº: 157) se alinearon y se identificaron regiones consenso de degeneración mínima con el fin de diseñar cebadores de oligonucleótidos degenerados. Los cebadores pr574 (SEC ID Nº:

166) y pr577 (SEC ID N°: 168) o los cebadores pr575 (SEC ID N°: 167) y pr577 (SEC ID N°: 168) pueden usarse para amplificar secuencias del ortólogo *rpl19* putativo de muchas especies de insectos diferentes.

5 La amplificación se logra usando un procedimiento de amplificación con rampa decreciente de temperatura con los parámetros de ciclos como se han descrito en el Ejemplo 6. El fragmento de ADN de aproximadamente 0,4 kb amplificado a partir del ADNc del gorgojo de la cápsula se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y el inserto se secuenció para confirmación. La secuencia ortóloga de *rpl19* (SEC ID N°: 158) se amplificó usando los cebadores pr568 (SEC ID N°: 162) y pr569 (**SEC ID N°: 163**), diseñados como cebadores “universales” para generar moldes de ADN con secuencias de promotores de polimerasa T7 flanqueantes de clones pCR2.1-TOPO.

### Ejemplo 9

10 Este ejemplo ilustra un bioensayo para determinar la toxicidad oral de ARNb hacia larvas del escarabajo rojo de la harina, *Tribolium castaneum*.

15 Algunas plagas de insectos son comercialmente importantes debido a que infestan los productos de materias primas y materiales procesados producidos a partir de un cultivo particular. Una plaga particular tal es el escarabajo rojo de la harina. La presencia de una o más especies de ARNb específicas para inhibición de uno o más genes en tales plagas en el producto de materia prima y materiales procesados producidos a partir de un cultivo particular sería útil en controlar tal infestación de plagas.

20 Se aisló ARN total de larvas del escarabajo rojo de la harina (RFB), *Tribolium castaneum*, usando el kit *mirVana* de Ambion (n° de catálogo 1560) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX). Para cada preparación se usaron larvas de RFB que ocupaban aproximadamente 200 µl de volumen en un tubo Microfuge. Se usaron cinco microgramos de ARN total para preparar ADNc usando el sistema de RT-PCR ThermoScript™ de Invitrogen (n° de catálogo 11146) y procedimientos recomendados para la síntesis de ADNc mediada por cebadores aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este ADNc se usó como molde para la amplificación de secuencias ortólogas de la subunidad 2 de V-ATPasa A usando ADN polimerasa Taq y los cebadores de oligonucleótidos pr550 (SEC ID N°: 160) y pr552 (SEC ID N°: 161).

25 Estos cebadores se diseñaron alineando las secuencias de nucleótidos para los ortólogos de V-ATPasa A más próximos de *Manduca sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster* y *Diabrotica virgifera* (WCR) y seleccionando regiones de degeneración mínima. El cebador pr550 se corresponde con los nucleótidos 230-252 en la secuencia del gen de *M. sexta* mientras que el cebador pr552 se corresponde con los nucleótidos 1354-1331 en la secuencia del gen de *M. sexta*.

30 La amplificación se logra usando un procedimiento de amplificación con rampa decreciente de temperatura con los parámetros de ciclos como se han descrito en el Ejemplo 6. El fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kb amplificado a partir del ADNc se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y el inserto se secuenció para confirmación. La secuencia ortóloga de V-ATPasa A (SEC ID N°: 150) se amplificó usando los cebadores pr568 (SEC ID N°: 162) y pr569 (**SEC ID N°: 163**), diseñados como cebadores “universales” para generar moldes de ADN con secuencias de promotores de polimerasa T7 flanqueantes de clones pCR2.1-TOPO.

35 Se sintetizaron ARN bicatenarios (ARNb) a partir de este molde de ADN amplificado usando el kit MEGAscript™ de Ambion (n° de catálogo 1626) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX) y se enviaron para bioensayo de insectos. Se mezcla uniformemente harina de trigo con agua y ARNb correspondiente a la secuencia ortóloga V-ATPasa A (SEC ID N°: 150) y se deja secar. La composición se usa como sustrato de bioensayo junto con larvas de escarabajo rojo de la harina. Se observan efectos insecticidas después de varios días de incubación extrayendo las larvas de gorgojo de la mezcla de harina/ARNb.

45 Pueden clonarse otras secuencias de genes diana de la harina del escarabajo rojo de la harina y usarse como moldes para la síntesis de ARNb *in vitro* que puede entonces probarse en bioensayo de insectos para evaluar su eficacia. Por ejemplo, el gen de la proteína ribosómica L19 (*rpl19*) puede usarse como molde para la síntesis de ARNb. Las secuencias de nucleótidos para los ortólogos *rpl19* de *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* y *Diabrotica virgifera* se alinearon y se identificaron regiones consenso de degeneración mínima con el fin de diseñar cebadores de oligonucleótidos degenerados. Los cebadores pr574 (SEC ID N°: 166) y pr577 (SEC ID N°: 168) o los cebadores pr575 (SEC ID N°: 167) y pr577 (SEC ID N°: 168) pueden usarse para amplificar secuencias del ortólogo *rpl19* putativo de muchas especies de insectos diferentes. La amplificación se logra usando un procedimiento de amplificación con rampa decreciente de temperatura con los parámetros de ciclos como se han descrito en el Ejemplo 6. El fragmento de ADN de aproximadamente 0,4 kb amplificado a partir del ADNc de escarabajo rojo de la harina se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y el inserto se secuenció para confirmación. La secuencia ortóloga de *rpl19* (SEC ID N°: 159) se amplificó usando los cebadores pr568 (SEC ID N°: 162) y pr569 (SEC ID N°: 163), diseñados como cebadores “universales” para generar moldes de ADN con secuencias de promotores de polimerasa T7 flanqueantes de clones pCR2.1-TOPO.

**Ejemplo 10**

Este ejemplo ilustra un bioensayo para determinar la toxicidad oral de ARNb para larvas blancas y gusanos de alambre.

5 Se aísla ARN total de larva blanca de larvas de gusano de alambre usando el kit *mirVana* de Ambion (n° de catálogo 1560) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX). Para cada preparación se usan larvas que ocupan aproximadamente 200 ul de volumen en un tubo Microfuge. Se usan cinco microgramos de ARN total para preparar ADNc usando el sistema de RT-PCR ThermoScript™ de Invitrogen (n° de catálogo 11146) y procedimientos recomendados para la síntesis de ADNc mediada por cebadores aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este ADNc se usa como molde para la amplificación de secuencias ortólogas de la subunidad 2 de V-ATPasa A usando ADN polimerasa Taq y los cebadores de oligonucleótidos pr550 (SEC ID N°: 160) y pr552 (SEC ID N°: 161).

10 Estos cebadores se diseñaron alineando las secuencias de nucleótidos para los ortólogos de V-ATPasa A más próximos de *Manduca sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster* y *Diabrotica virgifera* (WCR) y seleccionando regiones de degeneración mínima. El cebador pr550 se corresponde con los nucleótidos 230-252 en la secuencia del gen de *M. sexta* mientras que el cebador pr552 se corresponde con los nucleótidos 1354-1331 en la secuencia del gen de *M. sexta*.

15 La amplificación se logra usando un procedimiento de amplificación con rampa decreciente de temperatura con los parámetros de ciclos como se han descrito en el Ejemplo 7. El fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kb amplificado a partir del ADNc se clona en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y el inserto se secuencia para confirmación. La secuencia ortóloga de V-ATPasa A se amplifica usando los cebadores pr568 (SEC ID N°: 162) y pr569 (SEC ID N°: 163), diseñados como cebadores "universales" para generar moldes de ADN con secuencias de promotores de polimerasa T7 flanqueantes de clones pCR2.1-TOPO.

20 Se sintetizan ARN bicatenarios (ARNb) a partir de este molde de ADN amplificado el kit MEGAScript™ de Ambion (n° de catálogo 1626) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX) y se envían para bioensayo de insectos. Se observan efectos de la toxicidad oral después de varios días de bioensayo.

25 Pueden clonarse otras secuencias de genes diana de larvas blancas o gusanos de alambre y usarse como moldes para la síntesis de ARNb *in vitro* que puede entonces probarse en bioensayo de insectos para evaluar su eficacia. Por ejemplo, el gen de la proteína ribosómica L19 (*rpl19*) puede usarse como molde para la síntesis de ARNb. Las secuencias de nucleótidos para los ortólogos *rpl19* de *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* y *Diabrotica virgifera* se alinearon y se identificaron regiones consenso de degeneración mínima con el fin de diseñar cebadores de oligonucleótidos degenerados. Los cebadores pr574 y pr577 o los cebadores pr575 y pr577 pueden usarse para amplificar secuencias del ortólogo *rpl19* putativo de muchas especies de insectos diferentes.

30 La amplificación se logra usando un procedimiento de amplificación con rampa decreciente de temperatura con los parámetros de ciclos como se han descrito en el Ejemplo 7. El fragmento de ADN de aproximadamente 0,4 kb amplificado a partir del ADNc se clona en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y el inserto se secuencia para confirmación. La secuencia ortóloga *rpl19* se amplifica usando los cebadores pr568 (SEC ID N°: 162) y pr569 (SEC ID N°: 163), diseñados como cebadores "universales" para generar moldes de ADN con secuencias de promotores de polimerasa T7  
35 flanqueantes de clones pCR2.1-TOPO.

**Ejemplo 11**

Este ejemplo ilustra un bioensayo para determinar la toxicidad oral de ARNb hacia larvas de mosquito, *Aedes aegypti*.

40 Se aísla ARN total de larvas de *Aedes aegypti* usando el kit *mirVana* de Ambion (n° de catálogo 1560) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX). Para cada preparación se usan larvas de *Aedes aegypti* que ocupan aproximadamente 200 ul de volumen en un tubo Microfuge. Se usan cinco microgramos de ARN total para preparar ADNc usando el sistema de RT-PCR ThermoScript™ de Invitrogen (n° de catálogo 11146) y procedimientos recomendados para la síntesis de ADNc mediada por cebadores aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este ADNc se usa como molde para la amplificación de secuencias ortólogas de la subunidad 2 de V-ATPasa A usando ADN polimerasa Taq y los cebadores de oligonucleótidos pr550 (SEC ID N°: 160) y pr552 (SEC ID N°: 161).

45 Estos cebadores se diseñaron alineando las secuencias de nucleótidos para los ortólogos de V-ATPasa A más próximos de *Manduca sexta*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster* y *Diabrotica virgifera* (WCR) y seleccionando regiones de degeneración mínima. El cebador pr550 se corresponde con los nucleótidos 230-252 en la secuencia del gen de *M. sexta* mientras que el cebador pr552 se corresponde con los nucleótidos 1354-1331 en la secuencia del gen de *M. sexta*.

50 La amplificación se logra usando un procedimiento de amplificación con rampa decreciente de temperatura con los parámetros de ciclos como se han descrito en el Ejemplo 7. El fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kb amplificado a partir del ADNc se clona en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y el inserto se secuencia para confirmación. La secuencia ortóloga de V-ATPasa A se amplifica usando los cebadores pr568 (SEC ID N°: 162) y pr569 (SEC ID N°: 163).

163), diseñados como cebadores “universales” para generar moldes de ADN con secuencias de promotores de polimerasa T7 flanqueantes de clones pCR2.1-TOPO.

Se sintetizan ARN bicatenarios (ARNb) a partir de molde de ADN amplificado usando el kit MEGAscript™ de Ambion (nº de catálogo 1626) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX) y se envían para bioensayo de insectos. Se observan efectos sobre larvas de insecto después de varios días en bioensayo.

Pueden clonarse otras secuencias de genes diana de mosquitos y usarse como moldes para la síntesis de ARNb *in vitro* que puede entonces probarse en bioensayo de insectos para evaluar su eficacia. Por ejemplo, el gen de la proteína ribosómica L19 (*rpl19*) puede usarse como molde para la síntesis de ARNb. Las secuencias de nucleótidos para los ortólogos *rpl19* de *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* y *Diabrotica virgifera* se alinearon y se identificaron regiones consenso de degeneración mínima con el fin de diseñar cebadores de oligonucleótidos degenerados. Los cebadores pr574 y pr577 o los cebadores pr575 y pr577 puede usarse para amplificar secuencias del ortólogo *rpl19* putativo de muchas especies de insectos diferentes.

La amplificación se logra usando un procedimiento de amplificación con rampa decreciente de temperatura con los parámetros de ciclos como se han descrito en el Ejemplo 7. El fragmento de ADN de aproximadamente 0,4 kb amplificado a partir del ADNc se clona en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y el inserto se secuencia para confirmación. La secuencia ortóloga *rpl19* se amplifica usando los cebadores pr568 (SEC ID N°: 162) y pr569 (SEC ID N°: 163), diseñados como cebadores “universales” para generar moldes de ADN con secuencias de promotores de polimerasa T7 flanqueantes de clones pCR2.1-TOPO.

Se sintetizan ARN bicatenarios (ARNb) a partir de este molde de ADN amplificado usando el kit MEGAscript™ de Ambion (nº de catálogo 1626) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX) y se envían para bioensayo de insectos.

Se contempla que otras especies de mosquito están dentro del ámbito de la presente invención. Secuencias de genes diana adecuadas de especies de *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* pueden amplificarse usando cebadores de oligonucleótidos apropiados, clonarse en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y el inserto secuenciarse para confirmación. Las secuencias diana clonadas se amplifican usando cebadores pr568 (SEC ID N°: 162) y pr569 (SEC ID N°: 163), diseñados como cebadores “universales” para generar moldes de ADN con secuencias de promotores de polimerasa T7 flanqueantes de clones pCR2.1-TOPO. Se sintetizan ARN bicatenarios (ARNb) a partir de estos moldes de ADN amplificado usando el kit MEGAscript™ de Ambion (nº de catálogo 1626) y procedimientos recomendados (Ambion Inc., Austin, TX) y se envían para bioensayo de insectos

### Ejemplo 12

Este ejemplo ilustra cómo el ARNb preparado a partir de la región 3'UTR de V-ATPasa mostró la regulación por disminución de la diana.

Segmentos (aprox. 300 pb de ARNb) de la 3' UTR de V-ATPasa de WCR se han puesto en bioensayo de WCR y fracasaron en mostrar atrofia y mortalidad dentro de un periodo de bioensayo de 12 días. Segmentos de tamaño comparable dentro de la región codificante de la V-ATPasa muestran atrofia y mortalidad significativa a un intervalo de concentraciones. Las transferencias Northern que examinan el ARN total extraído de larvas de WCR alimentadas durante 4 días sobre un segmento de 3' UTR de V-ATPasa (y sondadas con una sonda de región codificante) mostraron una disminución significativa en el ARNm diana de V-ATPasa con respecto a larvas de control sin tratar (nº de NBP resumido 7497215). Sin embargo, quedaron mensajeros detectables, que indica inactivación menos eficaz de la diana con un segmento de ARNb de 3' UTR (frente a usar un segmento de la región codificante) y/o contribución de un segundo gen de V-ATPasa putativo que tiene una 3' UTR significativamente desviada del gen de V-ATPasa primario. Los datos de transferencia Southern sobre WCR están de acuerdo con más de una secuencia de genes de hibridación dentro del genoma, pero el examen de EST y PCR de familias limitada todavía no han demostrado que se transcriba un segundo gen putativo.

Es importante mencionar que aunque es crítico determinar el potencial para atrofiar y matar larvas, simplemente monitorizando la expresión de un gen diana por transferencia Northern o PCR cuantitativa también podrían encontrarse dianas aceptadas para estrategias de RNAi. Los resultados anteriores más otros experimentos de Northern que miran la diana de V-ATPasa han mostrado que el efecto del ARN sobre la abundancia de transcrito es perceptible en insectos en el plazo de horas desde la presentación del ARNb.

### Ejemplo 13

Este ejemplo ilustra un enfoque para implementar la supresión génica de plagas de insectos usando un procedimiento de silenciamiento mediado por ARNip-ta.

Un procedimiento alternativo para silenciar genes en una planta plaga usa la clase recientemente descubierta de ARN

interferente pequeño transactivador (ARNip-ta) (Dalmay y col., Cell 101:543-553, 2000; Mourrain y col., Cell 101:533-542, 2000; Peragine y col., Genes and Development, 18:2368-2379, 2004; Vazquez y col., Mol Cell 16(1):69-79, 2004; Yu y col., Mol Plant Microbe Interact 16:206-216, 2003). Los ARNip-ta se derivan de transcritos de ARN monocatenarios que son elegidos como diana por miARN que se produce naturalmente dentro de la célula. Los procedimientos para usar microARN para desencadenar ARNip-ta para silenciamiento de genes en plantas se describen en la solicitud de patente provisional de EE.UU. n° de serie 60/643.136 (Carrington y col. 2004), incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad. Al menos se identifica un miARN específico de plaga expresado en células epiteliales del intestino de larvas del gusano de la raíz del maíz. Este miARN específico para plaga se usa entonces para identificar al menos una secuencia de transcrito de ARN diana complementaria al miARN que se expresa en la célula. La secuencia diana correspondiente es una secuencia corta de no más de 21 nucleótidos contiguos que, cuando parte de un transcrito de ARN y se pone en contacto por su miARN correspondiente en un tipo de célula con una ruta de ARNi funcional, conduce a escisión mediada por elícer de dicho transcrito. Una vez se identifican secuencias de miARN diana, al menos una secuencia de miARN diana se fusiona con una segunda secuencia que se corresponde con parte de un gen de la plaga que va a silenciarse usando este procedimiento. Por ejemplo, la(s) secuencia(s) de miARN diana se fusiona(n) con secuencias del gen de ATPasa vacuolar (V-ATPasa) de gusano de la raíz del maíz. La secuencia diana de miARN puede ponerse en el extremo 5', el extremo 3', o incorporarse en el centro del gen de V-ATPasa. Puede ser preferible usar múltiples secuencias diana de miARN correspondientes a múltiples genes de miARN, o usar la misma secuencia diana de miARN múltiples veces en la quimera de la secuencia diana de miARN y la secuencia de V-ATPasa. La secuencia de V-ATPasa puede ser de cualquier longitud, con un mínimo de 21 pb.

La quimera de la(s) secuencia(s) diana de miARN y la secuencia de V-ATPasa se expresa en células de planta usando distintos elementos promotores apropiados y otros elementos reguladores de la transcripción, en tanto que la transcripción se produzca en tipos de células sujetas a ser proporcionadas en la dieta de la plaga, por ejemplo, raíces de maíz para el control de gusano de la raíz del maíz.

Este procedimiento puede tener la ventaja adicional de administrar moléculas de ARN más largas a la plaga diana. Normalmente, los ARNb producidos en plantas se procesan rápidamente por Dicer en ARN cortos que pueden no ser eficaces cuando se alimentan exógenamente a algunas plagas. En este procedimiento, un transcrito monocatenario se produce en la célula de planta, es captado por la plaga y se convierte en un ARNb en la célula de plaga en la que luego se procesa en ARNip-ta que pueda silenciar postranscripcionalmente uno o más genes en una o más plagas dianas.

#### Ejemplo 14

Este ejemplo ilustra la comparación de secuencias de ADNc de CRW con secuencias de fuentes distintas de CRW y la identificación de (1) secuencias en común con aquellas otras secuencias de fuentes y (2) secuencias que son únicas para CRW. Las secuencias de ADNc que están conservadas entre dos organismos son posibles candidatos de ARNi que pueden usarse para elegir como diana la expresión génica y función de ambos organismos. Alternativamente, puede ser deseable seleccionar secuencias para supresión génica de CRW para el que no está presente secuencia homóloga conocida en (a) otros organismos de plaga, (b) organismos no diana, y (c) el genoma de planta seleccionada para transformación con la secuencia de supresión de CRW.

Se seleccionaron seis secuencias de ADNc de CRW para comparación con secuencias de otras fuentes. Las secuencias específicas incluyeron secuencias que codifican alfa-tubulina, beta-tubulina, CHD3, subunidad de bombas E de protones vacuolares, subunidad de V-ATPasa A y proteínas fibrilares. Las secuencias de nucleótidos son como se exponen en SEC ID N°: 98, SEC ID N°: 99, SEC ID N°: 100, SEC ID N°: 101, SEC ID N°: 102, SEC ID N°: 103, respectivamente. Las secuencias de ADNc de CRW se compararon con todos los ADNc públicos de diversos organismos de GenBank usando el programa NCBI megablast (Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990), fijados los parámetros de búsqueda del siguiente modo:

-W 21 -b50 -v50

requiriendo al menos una coincidencia perfecta 21-mera y reteniendo solo las 50 mejores coincidencias iniciales y alineamientos. Los resultados se filtraron para incluir solo organismos en el orden *Insecta*, y se excluyó abeja de la miel (*Apis mellifera*). Aunque el análisis solo se hizo en las seis secuencias de ADNc de CRW, el mismo procedimiento puede aplicarse a todas las secuencias de ADNc o de Unigene en CRW u otros organismos de interés sin excesiva carga o experimentación.

Usando las seis secuencias de ADNc de CRW se identificaron un total de 145 coincidencias a partir de 20 organismos de insecto distintos. Éstos incluyeron varias especies de plagas, tales como áfido del guisante (*Acyrtosiphon pisum*), sílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*) y piojos humanos (*Pediculus humanus*).

Los resultados se presentan en la Tabla 4 a continuación con coordenadas de coincidencia sobre la secuencia de consulta y el éxito, porcentaje de identidad de la coincidencia y la especie de insectos de la que se derivó la secuencia de éxito. Por ejemplo, se identificó que un segmento desde la posición de nucleótido 844 a 1528 en SEC ID N°: era sustancialmente

idéntico a un segmento desde la posición de nucleótido 812 a 128 del número de acceso de secuencia de GenBank GI: 47521748 derivado de áfido del guisante (*Acyrtosiphon pisum*). Estas dos secuencias comparten el 85% de identidad.

Tabla 4. Secuencias de Unigene de CRW y homólogos de secuencias de nucleótidos de insecto

SEC ID N°1	Posición de identidad <sup>2</sup>	ID de gen <sup>3</sup>	Posición de identidad <sup>4</sup>	% de identidad <sup>5</sup>	Género y especie <sup>6</sup>
98	171-1529	GI:14279671	89-1447	83%	Chironomus tentans
98	175-938	GI:60297223	69-832	88%	Diaprepes abbreviatus
98	171-779	GI:49394745	79-687	89%	Drosophila melanogaster
98	769-1528	GI:47537494	827-68	85%	Acyrtosiphon pisum
98	529-1339	GI:55814359	56-865	85%	Acyrtosiphon pisum
98	729-1469	GI:46995994	1-741	85%	Acyrtosiphon pisum
98	171-740	GI:49395093	79-652	88%	Drosophila melanogaster
98	166-903	GI:60297353	68-804	85%	Diaprepes abbreviatus
98	171-875	GI:37593891	66-769	85%	Pediculus humanus
98	844-1528	GI:47521748	812-128	85%	Acyrtosiphon pisum
98	351-1255	GI:55798571	1-903	83%	Acyrtosiphon pisum
98	862-1528	GI:55815587	8-674	86%	Acyrtosiphon pisum
98	415-1520	GI:19773419	309-1414	81%	Bombyx mori
98	171-296	GI:19773419	65-190	88%	Bombyx mori
98	415-1520	GI:608680	309-1414	81%	Bombyx mori
98	171-296	GI:608680	65-190	88%	Bombyx mori
98	738-1434	GI:55811699	1-697	85%	Acyrtosiphon pisum
98	171-899	GI:37593910	70-799	85%	Pediculus humanus
98	171-1029	GI:55799535	53-911	83%	Acyrtosiphon pisum
98	817-1492	GI:35508998	7-681	85%	Acyrtosiphon pisum
98	171-845	GI:25959177	50-724	85%	Meladema coriacea
98	862-1528	GI:55803725	726-60	85%	Acyrtosiphon pisum
98	171-695	GI:49394718	79-603	88%	Drosophila melanogaster
98	838-1528	GI:55813912	827-137	85%	Acyrtosiphon pisum

ES 2 439 696 T3

(continuación)

SEC ID Nº <sup>1</sup>	Posición de identidad <sup>2</sup>	ID de gen <sup>3</sup>	Posición de identidad <sup>4</sup>	% de identidad <sup>5</sup>	Género y especie <sup>6</sup>
98	171-692	GI:49395499	54-575	88%	Drosophila melanogaster
98	171-1025	GI:46997250	92-945	83%	Acyrtosiphon pisum
98	171-1022	GI:47533429	4-855	83%	Acyrtosiphon pisum
98	171-998	GI:34788002	122-949	83%	Callosobruchus maculatus
98	171-839	GI:25959137	50-717	85%	Meladema coriacea
98	171-677	GI:49395221	84-590	88%	Drosophila melanogaster
98	171-809	GI:25959136	50-688	86%	Meladema coriacea
98	171-816	GI:37593801	66-712	85%	Pediculus humanus
98	171-816	GI:37593472	67-712	85%	Pediculus humanus
98	171-848	GI:25959229	47-724	85%	Meladema coriacea
98	171-677	GI:49395496	75-581	88%	Drosophila melanogaster
98	171-659	GI:49395250	83-571	89%	Drosophila melanogaster
98	171-1029	GI:46997155	98-953	83%	Acyrtosiphon pisum
98	904-1528	GI:47519891	752-128	86%	Acyrtosiphon pisum
98	199-1061	GI:55813341	8-870	83%	Acyrtosiphon pisum
98	760-1430	GI:60298750	9-679	85%	Diaphorina citri
98	171-998	GI:46997667	106-933	83%	Acyrtosiphon pisum
98	171-785	GI:25959104	69-684	85%	Meladema coriacea
98	922-1528	GI:25959369	697-91	86%	Meladema coriacea
98	922-1528	GI:25959412	698-92	86%	Meladema coriacea
98	171-772	GI:25959233	68-669	86%	Meladema coriacea
98	171-677	GI:49395121	74-582	88%	Drosophila melanogaster
98	199-1029	GI:47534273	1-830	83%	Acyrtosiphon pisum
99	90-1385	GI:34787982	56-1351	83%	Callosobruchus maculatus
99	74-797	GI:25958562	14-739	88%	Curculio glandium
99	572-1374	GI:60297081	25-827	86%	Diaprepes abbreviatus
99	100-1425	GI:19773425	91-1416	81%	Bombyx mori

ES 2 439 696 T3

SEC ID N°1	Posición de identidad <sup>2</sup>	ID de gen <sup>3</sup>	Posición de identidad <sup>4</sup>	% de identidad <sup>5</sup>	Género y especie <sup>6</sup>
99	100-1425	GI:2073100	111-1436	81%	Bombyx mori

(continuación)

SEC ID N°1	Posición de identidad <sup>2</sup>	ID de gen <sup>3</sup>	Posición de identidad <sup>4</sup>	% de identidad <sup>5</sup>	Género y especie <sup>6</sup>
99	55-738	GI:60297565	7-684	87%	Diaprepes abbreviatus
99	131-1425	GI:39842328	28-1322	81%	Laodelphax striatellus
99	688-1449	GI:60298019	9-770	85%	Diaprepes abbreviatus
99	61-606	GI:49394901	10-557	87%	Drosophila melanogaster
99	61-605	GI:49395418	12-558	87%	Drosophila melanogaster
99	100-1008	GI:2613140	68-976	81%	Manduca sexta
99	1064-1416	GI:2613140	1032-1384	83%	Manduca sexta
99	61-573	GI:49395445	15-528	87%	Drosophila melanogaster
99	40-582	GI:49395189	4-551	86%	Drosophila melanogaster
99	104-918	GI:47518537	27-841	82%	Acyrtosiphon pisum
99	104-784	GI:25959017	39-719	83%	Meladema coriacea
99	104-879	GI:47538212	85-860	82%	Acyrtosiphon pisum
99	104-852	GI:47520002	32-780	82%	Acyrtosiphon pisum
99	104-789	GI:47519819	118-803	83%	Acyrtosiphon pisum
99	104-789	GI:47532797	106-791	83%	Acyrtosiphon pisum
99	100-708	GI:53910346	73-681	84%	Heliconius erato petiverana
99	100-880	GI:6902132	54-834	82%	Bombyx mori
99	104-789	GI:46999310	91-777	83%	Acyrtosiphon pisum
101	113-263	GI:41578101	124-274	90%	Culicoides sonorensis
101	113-263	GI:41577171	65-215	90%	Culicoides sonorensis
101	113-308	GI:15466250	140-335	86%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:15530478	140-335	85%	Drosophila melanogaster
101	112-308	GI:15516090	140-336	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:49393479	52-247	85%	Drosophila melanogaster
101	113-263	GI:41577256	99-249	88%	Culicoides sonorensis
101	113-308	GI:41403307	84-279	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:41402978	79-274	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:41401487	82-277	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:38628155	176-371	85%	Drosophila melanogaster

ES 2 439 696 T3

SEC ID Nº <sup>1</sup>	Posición de identidad <sup>2</sup>	ID de gen <sup>3</sup>	Posición de identidad <sup>4</sup>	% de identidad <sup>5</sup>	Género y especie <sup>6</sup>
101	118-293	GI:16901350	70-245	87%	Ctenocephalides felis
101	118-293	GI:16900951	78-253	87%	Ctenocephalides felis

(continuación)

SEC ID Nº <sup>1</sup>	Posición de identidad <sup>2</sup>	ID de gen <sup>3</sup>	Posición de identidad <sup>4</sup>	% de identidad <sup>5</sup>	Género y especie <sup>6</sup>
101	113-308	GI:14708726	170-365	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14707923	171-366	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14708035	139-334	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14705944	135-330	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14705959	95-290	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14705165	108-303	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14703451	150-345	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14703188	95-290	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14700853	108-303	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14700635	136-331	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14699645	95-290	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14697887	94-289	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14697103	136-331	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14696099	137-332	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14696107	136-331	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14695238	95-290	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14693081	133-328	85%	Drosophila melanogaster
101	113-308	GI:14691490	138-333	85%	Drosophila melanogaster
102	694-1364	GI:2454487	811-1481	84%	Aedes aegypti
102	715-1220	GI:22039978	3-507	86%	Ctenocephalides felis
102	694-1175	GI:4734043	166-647	85%	Aedes aegypti
102	895-1286	GI:16899106	3-393	87%	Ctenocephalides felis
102	895-1286	GI:16899780	6-395	87%	Ctenocephalides felis
102	895-1286	GI:16899721	6-396	86%	Ctenocephalides felis
102	961-1286	GI:22039013	8-333	87%	Ctenocephalides felis
102	874-1327	GI:33376955	30-483	83%	Glossina morsitans morsitans
102	636-1136	GI:46997165	360-859	81%	Acyrtosiphon pisum

ES 2 439 696 T3

<b>SEC ID Nº<sup>1</sup></b>	<b>Posición de identidad<sup>2</sup></b>	<b>ID de gen<sup>3</sup></b>	<b>Posición de identidad<sup>4</sup></b>	<b>% de identidad<sup>5</sup></b>	<b>Género y especie<sup>6</sup></b>
102	874-1220	GI:33376948	25-371	84%	Glossina morsitans morsitans
102	943-1364	GI:3514814	74-495	82%	Drosophila melanogaster
102	943-1364	GI:24583987	1055-1476	82%	Drosophila melanogaster
102	694-884	GI:24583987	806-996	82%	Drosophila melanogaster

ES 2 439 696 T3

(continuación)

SEC ID N°1	Posición de identidad <sup>2</sup>	ID de gen <sup>3</sup>	Posición de identidad <sup>4</sup>	% de identidad <sup>5</sup>	Género y especie <sup>6</sup>
102	943-1364	GI:24583985	967-1388	82%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	694-884	GI:24583985	718-908	82%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	943-1364	GI:24583983	1052-1473	82%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	694-884	GI:24583983	803-993	82%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	943-1364	GI:18467973	1049-1470	82%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	694-884	GI: 18467973	800-990	82%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	943-1364	GI:19527546	1052-1473	82%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	694-884	GI:19527546	803-993	82%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	1045-1365	GI:4734199	1-321	84%	<i>Aedes aegypti</i>
102	943-1280	GI:51961912	81-418	83%	<i>Drosophila simulans</i>
102	734-947	GI:22039138	73-285	87%	<i>Ctenocephalides felis</i>
102	959-1364	GI:24583991	1081-1486	81%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	959-1364	GI:18467977	1081-1486	81%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	943-1340	GI:21355198	994-1391	81%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	694-884	GI:21355198	745-935	82%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	959-1364	GI:19528270	1021-1426	81%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	959-1364	GI:18859618	951-1356	81%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	943-1340	GI:1373432	994-1391	81%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	694-884	GI: 1373432	745-935	82%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	959-1364	GI:5851682	1021-1426	81%	<i>Drosophila melanogaster</i>
102	142-345	GI:22039875	163-366	87%	<i>Ctenocephalides felis</i>
102	142-345	GI:16901137	217-420	87%	<i>Ctenocephalides felis</i>
102	82-595	GI:34787824	112-625	79%	<i>Callosobruchus maculatus</i>
102	142-345	GI:16901267	156-360	87%	<i>Ctenocephalides felis</i>
102	771-1022	GI:22005558	58-309	84%	<i>Aedes aegypti</i>
102	96-357	GI:46996282	118-379	83%	<i>Acyrtosiphon pisum</i>
102	963-1364	GI:18898890	11-412	80%	<i>Anopheles gambiae</i>
102	967-1364	GI:18936027	25-422	80%	<i>Anopheles gambiae</i>
102	61-344	GI:37952369	124-407	81%	<i>Ips pini</i>
103	1230-1251	GI:33371240	247-268	100%	<i>Glossina morsitans morsitans</i>
103	1230-1251	GI:33374947	249-270	100%	<i>Glossina morsitans morsitans</i>

- 
1. SEC ID N° de WCR como se expone en el listado de secuencias;
  2. Posición de nucleótido en SEC ID N° en la columna 1 que presenta identidad sustancial con ID de gen en la columna 3 en la misma fila;
  3. Número de acceso de gen de secuencia de coincidencia correspondiente identificada dentro de la base de datos pública que presenta identidad sustancial con SEC ID N° de la columna 1;
  4. Posición de nucleótido de la secuencia identificada en columna 3 que coincide con nucleótidos de CRW especificados en la misma fila
  5. Porcentaje de identidad entre SEC ID N° de WCR e ID de gen (comparación de identidad entre las secuencia de la columna 2 y la columna 4 en cualquier fila dada); y
  6. Género y especie del organismo del que se derivó la secuencia de n° de acceso del gen
- 

### Ejemplo 15

5 Este ejemplo ilustra la identificación de dominios funcionales de proteínas predichos y familias de genes de la traducción de las secuencias de nucleótidos desveladas en el presente documento usando coincidencias de secuencia con secuencias conocidas y modelos consenso de dominios existentes.

10 Las secuencias de proteína se produjeron primero con una programa “traductor” que tradujo secuencias de Unigene en secuencias de péptidos mediante las siguientes etapas: homología con proteínas conocidas; predicción de la estructura génica desde el principio basándose en modelos; y marco de lectura abierto más largo (ORF). Se corrigieron desplazamientos del marco debido a errores de secuenciación. Las secuencias de proteína se buscaron entonces por comparación con la base de datos Pfam, una gran colección de múltiples alineamientos de secuencias y modelos ocultos de Markov (HMM) que cubrían muchas familias de proteínas comunes (The Pfam Protein Families Database, Bateman y col., Nucleic Acids Reseach 32:D138-D141, 2004). Los modelos HMM de proteína se buscaron por comparación con el programa HMMPAM (Durbin y col., Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids, Cambridge University Press, 1998), con las rigurosidades por defecto. Se hizo otra filtración para mantener solo aquellas coincidencias con un valor de esperanza de 0,1 o inferior como coincidencias significativas. De las 20303 secuencias de péptidos del gusano de la raíz del maíz, 4199 (21 %) se identificaron con 1317 dominios y familias de proteína distintos.

20 Los resultados del análisis se presentaron en los campos característicos del archivo de listado de secuencias con estos atributos: nombre de Pfam, descripción de Pfam y nivel de coincidencia con la puntuación de HMMPFAM, valor de esperanza (valor de E) y número de copias del dominio en la secuencia de péptidos.

### Ejemplo 16

25 Este ejemplo ilustra un procedimiento para proporcionar una secuencia de ADN para silenciamiento de genes mediado por ARNb. Más específicamente, este ejemplo describe la selección de un ADN mejorado útil en silenciamiento de genes mediado por ARNb (a) seleccionando de un gen diana una secuencia de ADN inicial que incluye más de 21 nucleótidos contiguos; (b) identificando al menos una secuencia de ADN más corta derivada de regiones de la secuencia de ADN inicial que consiste en regiones que se predice que no generan polipéptidos no deseables; y (c) seleccionando una secuencia de ADN para silenciamiento de genes mediado por ARNb que incluye la al menos un secuencia de ADN más corta. Polipéptidos no deseables incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos homólogos a polipéptidos alergénicos y polipéptidos homólogos a toxinas de polipéptido conocidas. Se ha demostrado que V-ATPasa de WCR funciona en ensayos de alimentación de gusano de la raíz del maíz para probar el silenciamiento mediado por ARNb como un medio de control del crecimiento de larvas. Una secuencia de ADNc de un gen de ATPasa vacuolar (V-ATPasa) de gusano de la raíz del maíz occidental (WCR) (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) se seleccionó para su uso como secuencia de ADN inicial (SEC ID N°. 104). Esta secuencia de ADN inicial se cribó para regiones dentro de que las que cada fragmento contiguo que incluye al menos 21 nucleótidos coincidió menos de 21 de los 21 nucleótidos contiguos de secuencias de vertebrado conocidas. Se identificaron tres segmentos de secuencia superiores a 100 nucleótidos contiguos que estuvieron libres de tales 21/21 éxitos; un primer segmento de secuencia correspondiente a la posición de nucleótido 739-839, un segundo segmento de secuencia correspondiente a la posición de nucleótido 849-987, y un tercer segmento de secuencia correspondientes a la posición de nucleótido 998-1166 como se expone en SEC ID N°. 104. Estos tres segmentos de secuencias se combinaron para construir una secuencia de ADN quimérica (SEC ID N°. 1) para su uso en silenciamiento de genes mediado por ARNb de la secuencia codificante de V-ATPasa de CRW correspondiente. La novedosa secuencia de ADN quimérica se probó en el bioensayo de CRW descrito anteriormente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Monsanto Technology LLC  
Baum, James A  
Gilbertson, Larry A  
5 Kovalic, David K  
LaRosa, Thomas J  
Lu, Maolong  
Munyikwa, Tichifa R. I.  
Roberts, James K  
10 Wu, Wei  
Zhang, Bei  
  
<120> Composiciones y procedimientos para el control de infestaciones de insectos en plantas  
  
15 <130> 38-21(53597)  
  
<150> 60560842  
  
<151> 09-04-2004  
20 <150> 60565632  
  
<151> 27-04-2004  
<150> 60579062  
  
25 <151> 11-06-2004  
<150> 60603421  
  
<151> 20-08-2004  
<150> 60617261  
30  
  
<151> 11-10-2004  
<150> 60xxxxxx  
  
<151> 07-04-2005  
35

# ES 2 439 696 T3

<160> 174

<210> 1

<211> 409

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 1

ggacaagaaa cttgccaac gtaagcactt cccttcagta gactggcttg gatcatattc	60
caaatattta agagcattgg acgactttta tgacaaaaac tttattcctc ttagaaccaa	120
agttaaggaa attcttcagg aagaagatga tctagccgaa attgtgcagc tggtaggtaa	180
agcatctctg gcagaaacgg acaaaatcac cttggaatt gccaggcttc ttaaagaaga	240
caaaactcat actcttctta tgacagattc tgtccattct ataaaactgt cggtaggttg	300
agaaacatga tcggtttgta cgacatggcg agacacgctg tagaatcaac cgcacaatca	360
gaaaataaga tcaactggaa cgtaataaga gattcaatga gtggaattt	409

<210> 2

15 <211> 157

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 2

20

atgtttcagg tgggctcaat aagcaccaac tttcaatttt atttttcatt ttgtattta	60
tttacagtaa ctctcagtt tgctaacaat attacattgt taacgcattc atatgttggt	120
taatataata gttttggaat ataattacaa gtttgtc	157

<210> 3

25 <211> 338

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 3

ES 2 439 696 T3

atTTTTattc tgTtaatagt tttTcacatt tcatgTttca cacatactta gatctagTca 60  
 agattgTtag agTttTggca aagaaattaa ataaaaattc tttTcataaa aatcattTct 120  
 tTaatattac attagagaaa aattatattt ttatactgag tacaattTg aacaagTtat 180  
 taattTtaag ttacaaaata cgctTttata ggTtaacaat tatcaaagcg ctTaaatcta 240  
 atagatacta cacaaatta aggactgcaa accatatctt tcacgaagta atccctacta 300  
 gtgaccaatt gctcgetagg agcagatgca aattacac 338

<210> 4

<211> 458

5 <212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 4

aaaagagtga ggaaacaggt taattataat gacggaggaa tgacaactga cacacgagaa 60  
 gatacgacat ggcaagaaaa tctctctgat taccattctg acttttctgc gggatcggat 120  
 gaggataagg aagacgatga tttogatgag aagaacgacg cagatttaag cagaaggagt 180  
 cgaagaaaga tggaaggaa agacgagaag gatcgtcctt taccaccggt actagccaga 240  
 gttggcggca atattgaagt actcggTTTT aatgccaggc agcgtaaagc gttccttaat 300  
 gctattatgc gctacggaat gccaccacaa gacgcttTca attcacagtg gctggTgaga 360  
 gatcttcgag gaaaatctga gaagatattc aaggcttacg tgtctctctt tatgaggcat 420  
 ctttgcgaaac ctggtgcaga taatgctgat acgTttgc 458

10

<210> 5

<211> 45

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

20 <400> 5

taatacgact cactataggg agagacggag gaatgacaac tgaca 45

<210> 6

<211> 44

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

5

<400> 6

taatacgact cactataggg agattccgta gcgcataata gcat 44

<210> 7

10

<211> 335

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15

<223> Secuencia artificial

<400> 7

taatacgact cactataggg agagacggag gaatgacaac tgacacacga gaagacacga	60
catggcaaga aaatctctcc gattaccatt ctgacttttc tgcgggatca gatgaggata	120
aggaagacga tgatttcgat gagaagaacg acgccgattt aagcagaaga agtcgaagaa	180
agatggaag aaaagacgag aaggaccgtc cactaccacc gttactagcc agagttgggg	240
gaaatattga agtgctcggg tttaatgccg ggcagcgtaa agcgttcctt aatgctatta	300
tcgctacgg aatctcccta tagtgagtgc tatta	335

20

<210> 8

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 8

30

tctgaattct ccgtagcgca taatagcat 29

ES 2 439 696 T3

<210> 9

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 9

10

gagcccgatt taagcagaag a 21

<210> 10

<211> 171

<212> ADN

15

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

20

<400> 10

tctgaattct ccgtagcgca taatagcatt aaggaacgct ttacgctgcc tggcattaaa 60

accgagcact tcaatatttc ccccaactct ggctagtaac ggtggtagtg gacggtcctt 120

ctcgtctttt ctttccatct ttcttcgact tcttctgctt aaatcggcgt c 171

<210> 11

25

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30

<223> Secuencia artificial

<400> 11

tcttctgctt aaatcggcgt cgaagacacg acatggcaag aaaat 45

ES 2 439 696 T3

<210> 12  
<211> 32  
<212> ADN  
5 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia artificial  
  
10 <400> 12  
gatcccgag aaaagtcaga atggaatcg ga 32  
  
<210> 13  
<211> 112  
15 <212> ADN  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia artificial  
  
20 <400> 13  
tcttctgctt aaatcggcgt cgaagacacg acatggcaag aaaatctctc cgattaccat 60  
tctgactttt ctgcgggatc tccgattacc attctgactt ttctgcggga tc 112  
  
<210> 14  
25 <211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificial  
  
<220>  
30 <223> Secuencia artificial  
  
<400> 14  
ctccgattac cattctgact ttc 24  
<210> 15

ES 2 439 696 T3

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 15

tctggatcct tccgtagcgc ataatagcat 30

10

<210> 16

<211> 245

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 16

20

```
ctccgattac cattctgact tttctgcggg atcagatgag gataaggaag acgatgatt 60
cgatgagaag aacgacgccg atttaagcag aagaagtcga agaaagatgg aaagaaaaga 120
cgagaaggac cgtccactac caccgttact agccagagtt gggggaaata ttgaagtgct 180
cggttttaat gccaggcagc gtaaagcgtt ccttaatgct attatgcgct acggaaggat 240
ccaga 245
```

25

<210> 17

<211> 473

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 17

ES 2 439 696 T3

tctgaattct ccgtagcgca taatagcatt aaggaacgct ttacgctgcc tggcattaaa 60  
 accgagcact tcaatatttc cccaactct ggctagtaac ggtggtagt gacggctcct 120  
 ctctctttt cttccatct ttcttcgact tcttctgctt aaatcgcgct cgaagacacg 180  
 acatggcaag aaaatctctc cgattaccat tctgactttt ctgcgggatc tccgattacc 240  
 attctgactt ttctgogga tcagatgagg ataaggaaga cgatgatttc gatgagaaga 300  
 acgacgccga ttaagcaga agaagtcgaa gaaagatgga aagaaaagac gagaaggacc 360  
 gtccactacc accgttacta gccagagttg ggggaaatat tgaagtgctc gttttaatgc 420  
 caggcagcgt aaagcgttcc ttaatgctat tatgcgctac ggaaggatcc aga 473

<210> 18

<211> 536

5

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 18

accgccatca tgttattggc atcacacatg tgctgtgtga gctctggaac tttcaacggt 60  
 ctgtattggt ggctgcctct tgaggtgagt ggagcgaatc cgggcatgaa gaagtggaga 120  
 cgggggaagg gaaccatggt gacagccaat tttctaagat cagcattcaa ctgacctggg 180  
 aacctaaagac aggtggttac accggacatt gtgagggata ccaaatggtt taagtctcca 240  
 tatgtgggtg ttgtgagttt caaagttctg aagcaaagt catagagagc ttcattatca 300  
 atacagtatg tttcatctgt gttttctacc aattgatgta ctgaaagtgt ggcattgtat 360  
 ggttctacta cggtatctga tactttgggt gaggggacta ctgagtatgt gttcataatt 420  
 ctgtctgggt atttctcacg gatttttgag atagggaggg taccataacc tgatccagta 480  
 ccacctcaa gtgagtgtgt gagttggaat ctttgtaaac aatcacatga tcagct 536

10

<210> 19

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 19

20

taatacgact cactataggg agagaatccg ggcatgaaga agtg 44

<210> 20

ES 2 439 696 T3

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 20

taatacgact cactataggg agacaaaaat ccgtaagaa tacc 44

10

<210> 21

<211> 399

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 21

20

```
taatacgact cactataggg agagaatccg ggcatagaaga agtggagacg ggggaagga 60
accatggtga cagccaattt tctaagatca gcattcaact gacctgggaa cctaagacag 120
gtggttacac cggacattgt gagggatacc aaatggttta agtctccata tgtgggtgtt 180
gtgagtttca aagttctgaa gcaaagtca tagagagcct cattatcaat acagtatgtt 240
tcactctgtgt tttctaccaa ttgatgtact gaaagtgtgg cattgtatgg ttctactacg 300
gtatctgata ctttgggtga ggggactact gagtatgtgt tcataattct gtctgggtat 360
tcttcacgga tttttgtctc cctatagtga gtcgtatta 399
```

<210> 22

<211> 26

25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

30

# ES 2 439 696 T3

<400> 22  
actgaattct ccgggcatga agaagt      26

5      <210> 23  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

10      <220>  
<223> Secuencia artificial

15      <400> 23  
tattctcac ggattgac      19

20      <210> 24  
<211> 267  
<212> ADN  
<213> Artificial

25      <220>  
<223> Secuencia artificial

30      <400> 24

	actgaattct ccgggcatga agaagtggag acgggggaag ggaaccatgt tgacagccaa	60
25	ttttctaaga tcagcattca actgacctgg gaacctaaagg caggtgggta caccggacat	120
	tgtgagggat accaaatggt ttaagtctcc gtatgtgggt gttgtgagtt tcaaagttct	180
	gaagcaaatg tcatagagag cttcattatc aatacagtat gtttcacctg tgttttctac	240
	caattgatgt caaatccgtg aagaata	267

30      <210> 25  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>

# ES 2 439 696 T3

<223> Secuencia artificial  
<400> 25  
caaatccgtg aagaata 17

5 <210> 26  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Secuencia artificial  
  
<400> 26  
ctgaaagtgt ggcgttgta 19

15 <210> 27  
<211> 106  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Secuencia artificial  
  
<400> 27  
caaatccgtg aagaatacc agatagaatt atgaacacat actcagtagt cccctetccc 60  
aaagtatcag ataccgtagt agaaccatac aacgccacac tttcag 106

25 <210> 28  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Secuencia artificial

# ES 2 439 696 T3

<400> 28  
tagaaccata caacgccaca ct 22

<210> 29  
5 <211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Secuencia artificial

<400> 29  
tctggatcca cggggaagg gaacc 25

<210> 30  
15 <211> 257  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
20 <223> Secuencia artificial

<400> 30

	tagaaccata caacgccaca ctttcagtac atcaattggt agaaaacaca gatgaaacat	60
	actgtattga taatgaagct ctctatgaca tttgcttcag aactttgaaa ctcacaacac	120
	ccacatacgg agacttaaac catttggtat ccctcacaat gtcoggtgta accacctgcc	180
	ttaggttccc aggtcagttg aatgctgatc ttagaaaatt ggctgtcaac atggttccct	240
25	tccccgtgg atccaga	257

<210> 31  
<211> 586  
<212> ADN  
30 <213> Artificial

<220>

# ES 2 439 696 T3

<223> Secuencia artificial

<400> 31

```
actgaattct cgggcatga agaagtggag acgggggaag ggaaccatgt tgacagccaa    60
ttttctaaga tcagcattca actgacctgg gaacctaaagg cagggtggta caccggacat    120
tgtgagggat accaaatggt ttaagtctcc gtatgtgggt gttgtgagtt tcaaagttct    180
gaagcaaatg tcatagagag cttcattatc aatacagtat gtttcatctg tgttttctac    240
caattgatgt caaatccgtg aagaataccc agatagaatt atgaacacat actcagtagt    300
cccctctccc aaagtatcag ataccgtagt agaaccatac aacgccacac tttcagtaca    360
tcaattggta gaaaacacag atgaaacata ctgtattgat aatgaagctc tctatgacat    420
ttgcttcaga actttgaaac tcacaacacc cacatacggg gacttaaacc atttggatc    480
cctcacaatg tccgggtgaa ccacctgcct taggttccca ggtcagttga atgctgatct    540
tagaaaattg gctgtcaaca tggttccctt cccccgtgga tccaga                    586
```

5

<210> 32

<211> 399

<212> ADN

<213> *Diabrotica virgifera*

10

<400> 32

```
acgcgtccag ttaatatccc gtgagatatt tttgcagtcc ttttaataag attcttcata    60
attcaccatg aagggtgctg ttttcaacat cgacaacggt tatttggaag gcctgtgtcg    120
tggctttaa tgtgggatcc tgaaacacgc cgattatttg aatttgggcc agtgtgaaac    180
tcttgaagat ttaaaactgc acttgcaagg cactgactat ggaacttttt tggccaatga    240
accttcacct ttgtcagtat ccgtcatcga ttcaagactt cgacaaaaac tcctgattga    300
gttcagcacc atgcgtaacc aagcagtaga gcctctctcg acatttatgg gcttcattac    360
ctacagttac atgatcgaca acataatttt gcttattac                    399
```

15

<210> 33

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Secuencia artificial

ES 2 439 696 T3

<400> 33  
 taatacgact cactataggg agaaacgggt attggaagg 40  
 <210> 34  
 <211> 43  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 10  
 <400> 34  
 taatacgact cactataggg agattgtcga tcatgtaact gta 43  
 <210> 35  
 15 <211> 291  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Secuencia artificial  
 <400> 35  
 taatacgact cactataggg agaaacgggt attgcaagg tttgactgta tattattatt 60  
 tttatgtatc gacatygatg aattgattta tttatcgtaa agaaattcaa atacatttaa 120  
 agcttcaaata attaataata atgaacaagc tttgaagggt tacaacaac caatcgatct 180  
 attaatatag tctattgact ctgaagttgc aaacgggtaat agggccaatg caatggtttg 240  
 attotcccta cagttacatg atcgacaact ccctatagtg agtcgtatta a 291  
 25  
 <210> 36  
 <211> 451  
 <212> ADN  
 <213> Diabrotica virgifera  
 30  
 <400> 36

# ES 2 439 696 T3

```

ccacatacca cgctatgaaa cccccttata tggggccgat ctaacaggag tgtggaactc    60
tatatccatt atatctaaaa tggttaacag aaaagaattc ataattaaca ttcaattgcc    120
attgtacacg tatattctgg taaatctact actactggac atttaattta caaatgtagt    180
ggtatcgaca aacttaccat cgaaaagttc caaaaagaat cccaacaat gggtaaaggc    240
taattcaaat atgcctgggt actctacata cttacagccc atagagaacg tggattacc    300
attgatattg ctgtgcggaa attcgaaca gctaaatact attgaacat cattgatgcc    360
cctggcacag atatttcatt aataacatta tcaactgtac attacaatct gactgtgctg    420
tactcattga tgcaactggt acttggaat t                                     451

```

<210> 37

<211> 44

5

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 37

taatacgact cactataggg agacacgcta tgaaccccc ttat 44

<210> 38

15

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20

<223> Secuencia artificial

<400> 38

taatacgact cactataggg agatttcgaa ttccgcaca gc 42

25

<210> 39

<211> 933

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 439 696 T3

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 39

5

```
taatacgact cactataggg agatttcgaa tttccgcaca gcaagtgtgt aacttaaatt 60
tcaaaaaact tttcgttgc ccaatttttt ttcataatct tagcggttac gattcgcata 120
tgatgattag agatcttgcg aaaaatggta gtatcagctt actaccaata aataaggaaa 180
agtatatttc atttacaata tacgattctg aggtcagtat taggttgagg ttcgttgatt 240
cactgagatt tttaaattca tcattggaca agttggctgc cacattgcaa cctgaggatt 300
taagatattt agctagcga tttccaaata ccaactaccga acaaatggaa ttattgaaac 360
gaaaaggcat attcccatac gaatatattg agtctttcaa taaattgaat gaaacgcaac 420
taccatcaat tgataaattt tacagctcat tatcgggtga aaacatctcc aaaaatagtt 480
atcatcatgc tcagaatggt tggcagctcat tcggtattaa aaatattttg gaatatagta 540
tgttgtacat gaaaactgat attatgttac tgacttgcat ttttgaaaat tttcgacaaa 600
aatgtcgaag tacatacagt cttgatcctg catggtacta taccatgcct ggattttctt 660
gggatgcaat gcttaaatat actggatgta aacttgaact gctgaatgat atcgataaaa 720
tcatgtttat tgagaaagct atccgaggtg gtataagtca agtaagtaat cggatttctg 780
aggcaataa caaatacatg cataattatg atccatcaaa gcctagttaa tatgtgctat 840
atthagatgt caacaatttg tatggttggg caatgtctca attattacca taagggggtt 900
tcatagcgtg tctccctata gtgagtcgta tta 933
```

<210> 40

<211> 918

10

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 40

15

```
cccaagcgtc cgcccacgcg tccgcccacg cggccccccc cgccgcccgc acgggtgtgga 60
```

ES 2 439 696 T3

cctcgcgcct ggtgttacat cccaagtagt gttcctttta ttctaagttt aatttcgaac 120  
 agttgcattt actttatttc caaacaatca aaatgggtaa agaaaagatt catattaaca 180  
 tcgttgtcat tggacacgta gattctggta aatctactac tactggacat ttaatttaca 240  
 aatgtggtgg tatcgacaaa cgtaccatcg aaaagttcga aaaagaagcc caagaaatgg 300  
 gtaaaggttc attcaaatat gcctgggtac tcgacaaact taaggccgag agagaacgtg 360  
 gtattaccat tgatattgct ttgtggaaat tcgaaacagc taaatactat gtaaccatca 420  
 ttgatgcccc tggacacaga gatttcatta agaacatgat cactggtaca tcacaagctg 480  
 actgtgctgt actcattggt gcagctggta ctggtgaatt tgaagcaggt atttcaaaga 540  
 atggacaaac acgtgaacat gctcttcttg ctttcaccct tgggtgtaaa caacttattg 600  
 ttgggtgcaa caaaatggac tcgactgaac cagcatacag tgaatcacgt ttcgaggaaa 660  
 tcaagaagga agtatcctca tacatcaaga aaattggtta caaccagct gccgttgctt 720  
 tcgtaccaat ttcaggatgg cacggagaca acatgttaga aggatctgac aagatgccat 780  
 ggttcaaggg atggcaaatc gaacgtaaag aaggaaaagc tgaaggaaag tgcttgattg 840  
 aggctttgga tgctatcctt ccccccacctc gtccaactga gaaaccctc cgtcttcac 900  
 tccaggatgt ctacaaaa 918

<210> 41

<211> 41

5

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 41

taatacgact cactataggg agacctcgcg cctggtgta c 41

<210> 42

15

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20

<223> Secuencia artificial

<400> 42

taatacgact cactataggg agaccaaggg tgaagcaag aagag 45

ES 2 439 696 T3

<210> 43

<211> 569

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 43

10

```

taatacgact cactataggg agacctcgcg cctgggtgta catcccaagt agtggtcctt    60
ttattctaag ttttaatttcg aacagttgca ttactttat ttccaaacaa tcaaaatggg    120
taaagaaaag attcataatta acatcgttgt cattggacac gtagattctg gtaaacttac    180
tactactgga catttaattt acaaatgtgg tggatcgcac aaacgtacca tcgaaaagtt    240
cgaaaaagaa gcccaagaaa tgggtaaagg ttcaattcaa tatgcctggg tactcgacaa    300
acttaaggcc gagagagaac gtggtattac cattgatatt gctttgtgga aattcgaaac    360
agctaaatac tatgtaacca tcattgatgc ccctggacac agagatttca ttaagaacat    420
gatcactggt acatcacaag ctgactgtgc tgtactcatt gttgcagctg gtactgggta    480
atttgaagca ggtatttcaa agaatggaca aacacgtgaa catgctcttc ttgctttcac    540
ccttggcttc cctatagtga gtcgtatta                                     569
    
```

<210> 44

15

<211> 440

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 44

20

```

tcgcgggccg acacacgcct ccatattaag tcttgaaagt cttttttaa aacattttaa    60
tttaaaagta gtatttttaa gatttttcat ttccacacca gttcataatg gcatctggtt    120
caatatacga cgctgcacat aaggagatt ttgaatatgt ttccaaaag attgaagagg    180
atccactaat tataaaagca ccagactcta gtaaaggct tctaattcat tgggcagttc    240
tcagcggaaa tgtaaagctt gttactcatt tactggaact tggatcttct gtgaaccctt    300
cggatgatac agatatgaca ccattaatat tagcttcacg ggctggccat accgaagttg    360
tcaaattggt attaaaaaaa tgtgatgatg tcaatcataa aaatgcacag ggcatctcat    420
cacttcagta tgcagcctcc                                     440
    
```

<210> 45

# ES 2 439 696 T3

<211> 46

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 45

taatacgact cactataggg agaacgctgc acataagga gatttt 46

10

<210> 46

<211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 46

20

taatacgact cactataggg agaggaggct gcatactgaa g 41

<210> 47

<211> 1113

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

30

<400> 47

ES 2 439 696 T3

taatacgact cactataggg agaacgctgc acataagggg gattttgact atgtttcaga 60  
 aaagattgaa gagtttccaa taattttaga agcaccagac tctgtaagtt gtaattat 120  
 gtatattatt atctaagctt aatctctaga cgaaccttta ttatatccaa tctctaccgt 180  
 gcaatactaa aatgtaccac gtacatttgt agttcctttg atttttttaa tttcattttt 240  
 ttaacaggtt ttgcaaatgt atacattttt attttggtta catagtcagg ttatacagtc 300  
 cgtataat 360  
 caataatttc tctatctagt atagaacca tgtcacctta tcaacctatt 360  
 atcctgcata tttaaatgca gtaaaaccac atttaaaaac atattttctg gtatctcata 420  
 gccatttcta tctctaatg gatgtgcata ggcttcttct aaagttttct agtttctatg 480  
 aagttacaaa gtagtttctt gttatttctt tgagaacatt tgttcatatg ataggtggtt 540  
 catattatct gacagtttca gcttacaagt gaagcagtag catctccaga agatgccaac 600  
 ccctagtggt ggtgaaacgt cgagaactac ttgacagtct aagagcccca acaaacagtt 660  
 taacaagttg gtgtgcattt agttgataga attctgtcag gttcttggat actccattgt 720  
 attggtttat tttatttaac taatttctc tctcttggtt ctctttacta ttccaaaact 780  
 aaaaattttt tattgtatag attcattttg ttgttgagct tatatattgt gctattgacc 840  
 aataatcaaa tacttttttag agtaagaggc ttgtaattca ttgggcagtt ctcagcggaa 900  
 atgtaaagct tgttacctat ttactgaaac ttggatctcc tgtgaaactcc tcagatgata 960  
 cagatatgac accattaata ttagcttcat cagctggcca taccgaagtt gtcaaattgt 1020  
 tattaaaaaa atgtgatgat gtcaatcata aaaaatgcaca gggccattca tcacttcagt 1080  
 atgcagcctc cctccctata gtgagtcgta tta 1113

<210> 48

<211> 425

5

<212> ADN

<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 48

aggattttct gaagctgccg aagtaactgg actcaatcca gcccaaatat ccgtcattat 60  
 gaagaacctg atggctcgat tgggattcca gaagtactac cttcagggag gtgattgggg 120  
 ttccgcaata gtagcact tagcatcatt attcccagaa aaagtgctgg gagtccattc 180  
 caatatgtgt atggcaata gtatgcttcc taatctaaaa ttagcattgg gtatgtttat 240  
 gccatccttg atgttgatg ctgacaagca acatctcctt tatcccagaa tgaacattt 300  
 tggattcctt atattgaaa gtggttatat gcatcttcag ggtagtaaac cagataccgt 360  
 tgggtgctct ctacgtgata gcctgtagg tcttgcagct tacatcatag agaagtttca 420  
 cacat 425

10

<210> 49

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

5

<400> 49

taatacgcact cactataggg agatctgaag ctgccgaagt aa 42

<210> 50

10

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15

<223> Secuencia artificial

<400> 50

taatacgcact cactataggg agatcaccg tagagcgaca ccaa 44

<210> 51

20

<211> 47

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25

<223> Secuencia artificial

<400> 51

taatacgcact cactataggg agactatgat gtaagctgca agacctta 47

30

<210> 52

<211> 95

<212> ADN

<213> Artificial

35

ES 2 439 696 T3

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 52

5

```
taatacgact cactataggg agatcgcgat gagtagaccc aacacctctg gtaagggtc 60
tcatgcattg tttctccta tagtgagtgc tatta 95
```

<210> 53

<211> 427

10

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 53

15

```
gacgcgcggg tcgatgcaag actctagata gagtcgtaat attgtcaact ttttcgtttc 60
ggtaaaattt atactaacta gccgtcagaa aagttactaa ttctccagtt atttaattga 120
gaatttgact ttattcgtca ctagcgcgaat aactcagtat ggtgattatt aattcattta 180
aacaccccga gtctcctatt aggtatcaac aggacgatgt tcaagtctac ttagacaaga 240
aagatgtggg cctgggaact ttatttgta gtgaaagcac attatgctgg caacaagaag 300
agaacaatgg ttttgctatt gaatattcaa gtatttcctt gcatgccata tctaaagatt 360
taaacattca ttctacagaa tgtgtatacc tcgtgacaga tggacatatt actatgccag 420
gtgacag 427
```

<210> 54

<211> 43

20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

25

<400> 54

```
taatacgact cactataggg agactagccg tcagaaaagt tac 43
```

<210> 55

ES 2 439 696 T3

<211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 55

taatacgact cactataggg agaatgcat gcaaggaat a 41

10

<210> 56

<211> 318

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 56

20

```
taatacgact cactataggg agactagccg tcagaaaagt tactaattct ccagttattt 60
aattgagaat ttgactttat tcgtcactag cgcaataact cagtatggtg attattaatt 120
catttaaaca ccccgagtct cctattaggt atcaacagga cgatgttcaa gtctacttag 180
acaagaaaga ttgggocctg ggaactttat ttgttagtga aagcacatta tgctggcaac 240
aagaagagaa caatggtttt gctattgaat attcaagtat ttccttgcat gccattctcc 300
ctatagtgag tcgtatta 318
```

<210> 57

<211> 431

25

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 57

# ES 2 439 696 T3

```

caattattca cagaacaaca attatacaga atagaccact atttgggtaa ggaaatggta      60
cagaatttaa tgacacttcg atttggtaac agaatcttta accccacatg gaacagtgac      120
catatagctt ccatccaaat aaattgtaag gaacccttcg gaactgaagg cagaggaggg      180
tattttgacg aattcggcat tattagggat gtaatgcaga atcatatddd acaaattcta      240
gctctagtag ctatggaaaa accagcttca gttcaaccag acgatataag aatgaaaaag      300
gtaaaggat taaaaagtat agctccaata aagctcaagg acgttgtatt gggtcagtac      360
gttgaaaatc ctgatggaca aggtaatgag aaattgggat acttagatga tccgagtgtt      420
cctaaagatt c                                                              431

```

```

5  <210> 58
   <211> 47
   <212> ADN
   <213> Artificial

   <220>
   <223> Secuencia artificial

10 <400> 58
    taatacgact cactataggg agaacagtga ccatatagct tccatcc      47

   <210> 59
15 <211> 45
   <212> ADN
   <213> Artificial

   <220>
20 <223> Secuencia artificial

   <400> 59
    taatacgact cactataggg agaatttcgc attacctgt ccatc      45

25 <210> 60
   <211> 328
   <212> ADN
   <213> Artificial

```

ES 2 439 696 T3

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 60

5

```
taatacgact cactataggg agaacagtga ccatatagct tccatccaaa taaattgtaa 60
ggaacccttc ggaactgaag gcagaggagg gtatTTtgac gaattcggca ttattagga 120
tgtaatgcag aatcatatTT tacaattct agctctagta gctatggaaa aaccagcttc 180
agttcaacca gacgatataa gaaatgaaa ggtaaaggta ttaaaaagta tagctccaat 240
aaagctcaag gacgttgat tgggtcagta cgttgaaaT cctgatggac aaggtaatgc 300
gaaattctcc ctatagtgag tcgtatta 328
```

<210> 61

<211> 483

10

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 61

```
accacgcct accccgccc gtgatattta gtgcttactt ggtacagcag tttcagtgc 60
gtgctttaga ataatttatt ttttaacatt tatatagaaa tcaaatacta accaatcaac 120
atgtgtgaag aagaagttgc cgctttagtc gtagacaatg gatccggtat gtgcaaagct 180
ggttttgctg gggatgatgc acctcgtgct gtattccctt caattggtgg acgccaaga 240
catcagggtg tgatggtagg aatgggacaa aaagattcct atgtaggtga tgaagctcaa 300
agtaaaagag gtatccttac cttaaaatac cccatcgagc acggaatagt cacaaactgg 360
gatgatatgg agaaaatttg gcatcataca ttctacaatg aactcagagt agccccagaa 420
gaaaccctg ttctgttgac agaagctcct ctcaaccca aggccaacag ggaaaagatg 480
aca 483
```

15

<210> 62

<211> 45

<212> ADN

20

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

ES 2 439 696 T3

<400> 62

taatacgcact cactataggg agaccgcccc gtgatattta gtgct 45

<210> 63

5 <211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia artificial

<400> 63

taatacgcact cactataggg agactgttg cctgggggt gagag 45

15 <210> 64

<211> 503

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Secuencia artificial

<400> 64

taatacgcact cactataggg agaccgcccc gtgatattta gtgcttactt ggtacagcag	60
tttcagtgct gtgctttaga ataatttatt ttttaacatt tatatagaaa tcaaatacta	120
accaatcaac atgtgtgaag aagaagttgc cgcttttagtc gtagacaatg gatccggtat	180
gtgcaaagct ggttttgctg gggatgatgc acctcgtgct gtattccctt caattggttg	240
acgccaaga catcagggtg tgatggtagg aatgggacaa aaagattcct atgtaggtga	300
tgaagctcaa agtaaaagag gtatccttac cttaaaatac cccatcgagc acggaatagt	360
cacaaactgg gatgatatgg agaaaatttg gcatcataca ttctacaatg aactcagagt	420
agccccagaa gaacaccctg ttctggtgac agaagctcct ctcaacccca aggccaacag	480
tctccctata gtgagtcgta tta	503

25

<210> 65

<211> 407

ES 2 439 696 T3

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 65

5

```
aggatgaatgt tatatcgttt ttcaaagtgt aagggtgitta ttttcaaaaa gtttataaaa 60
taagcaatca ctatgggtaa tegtgttgca aatttattca aaggcctctt tggcaaaaag 120
gaaatgagga tattgatggt acgactcgat gcagctggta aaaccacaat tttatataaa 180
cttaaattag gagaaattgt aacaactatt ccaacaattg gatttaattg ggagactgta 240
gaatataaga acattagttt tacagtatgg gatgtagggtg gtcaagataa aattaggcca 300
ttgtggagac actatttcca aaacacacaa cgcctaattt tcgtagtaga cagtaaccac 360
acggaaacta acactgaggc taaagattaa ttaatgcgtt agttggg 407
```

<210> 66

<211> 42

10

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

15

<400> 66

```
taatacgact cactataggg agaactatgg gtaatgtgtg tg 42
```

<210> 67

20

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25

<223> Secuencia artificial

<400> 67

```
taatacgact cactataggg agagttccg tgtggttact 40
```

30

<210> 68

# ES 2 439 696 T3

<211> 345

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 68

```
taatacgact cactataggg agaactatgg gtaatgtggt tgcaaattta ttcaaaggcc 60
tctttggcaa aaaggaatg aggatattga tggtagcact cgatgcagct ggtaaaacca 120
caattttata taaacttaa ttaggagaaa ttgtaacaac tattccaaca attggattta 180
atgtggagac tgtagaatat aagaacatta gttttacagt atgggatgta ggtggtcaag 240
ataaaattag gccattgtgg agacactatt tccaaaacac acaacgccta attttcgtag 300
tagacagtaa ccacacggaa actctcccta tagtgagtcg tatta 345
```

10

<210> 69

<211> 456

<212> ADN

15

<213> Diabrotica virgifera

<400> 69

```
tcgcgggtcg atacaagcgt ctaaacacac gttctgatga catcaatttc taaaaatggt 60
cgcaaattcc taccaaagcg gettcatttc aatattctac agcgtaggaa gtaatccact 120
agcattatgg gacaagcagg taaagaacgg acatatcaga cggattatgg acgatgatgt 180
gaaatcatta gttttgaaa tatctggaac taatgtagct actactata taacgtgccc 240
catcaaacca cgagcttcac ttggaatcag attacctttt ctgattatga ttataaagaa 300
tatgaagaag tactttacat ttgaaattca aatattagat gataaagata tgcgtagaag 360
gtttagaata tcaaatttcc aatcatccac caaagtgaga ccgttctgta caacgatgcc 420
aatgggactc agcagtggct ggaatcaagt tcaatt 456
```

20

<210> 70

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

25

ES 2 439 696 T3

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 70

5 taatacgact cactataggg agacgggtcg atacaagcgt ctaa 44

<210> 71

<211> 44

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

15 <400> 71

taatacgact cactataggg agaagtcca tggcatcgt tgta 44

<210> 72

<211> 472

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

25

<400> 72

taatacgact cactataggg agacgggtcg atacaagcgt ctaaacacac gttctgatga 60  
 catcaatttc taaaaatggt cgcaattcc taccaaagcg gcttcatttc aatattctac 120  
 agcgtaggaa gtaatccact agcattatgg gacaagcagg taaagaacgg acatattcaga 180  
 cggattatgg acgatgatgt gaaatcatta gttttggaaa tatctggaac taatgtagct 240  
 actacttata taacgtgccc catcaaacca cgagcttcac ttggaatcag attacctttt 300  
 ctgattatga ttataaagaa tatgaagaag tactttacat ttgaaattca aatattagat 360  
 gataaagata tgcgtagaag gtttagaata tcaaatttcc aatcatccac caaagtgaga 420  
 ccgttctgta caacgatgcc aatgggactt ctcoctatag tgagtcgtat ta 472

ES 2 439 696 T3

<210> 73

<211> 503

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

5

<400> 73

```
cacgcgtcca aatcaatcc ttgaaaaag gcaacttcac ggaactttta caaaaactta 60
gtaaggttct aaaaccccag ggatacttat taagtgcagc agctccggga gcacgtgata 120
aaattgatga accttacgac attccagcga tttcaaagct actagacttg gtcaatgtta 180
tggttttcga tttccacggc gcttttgaca actatgtagg acatatctca ccgctttttc 240
ccgctaaagt tgactacgat tactataata ataaaacata caatgtggat acaggaattc 300
aatattggtt gaatggtggt gcagatcctg caaaattaa cttgggtggt gtcgcttatg 360
gaagaacttt tactttggct gataaaaata ataccgctct atatgctcct gtcaaaggtg 420
gaggtagcagt tggacottat tcacaacaat ctggatattt gggatataat gagatttgca 480
gatactatac cgactcaact tac 503
```

10

<210> 74

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 74

20

```
taatacgact cactataggg agacacgct ccaaaatcaa tc 42
```

<210> 75

<211> 47

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

ES 2 439 696 T3

<400> 75

taatacgact cactataggg agatcggtat agtatctgca aatctca 47

<210> 76

5 <211> 417

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia artificial

<400> 76

taatacgact cactataggg agacaaacat caggtgcgga aaaaacacga gaggctaata 60  
ccaagtgatg cgcacgttgc caaatggaga tgtgttggtc ttctgtcagt cacaaccgca 120  
aggcagtggtg aaatgtgaag ttatgtgatt tactttgaaa aaaacagata aggattacgt 180  
aagatgagca attcatgtac tagtacaatt aaagttattg aaaataacac aattcttgta 240  
gaatggcaaa aacatcatta tggatcatatt ttgattcgc aacatattaa ttacaaaag 300  
aaagataata acataatagg ttcaaagcta atatcggagt cccatagcaa aggtaaaaaa 360  
attgtttttc ttttttttct tacttaaaaa attctctccc tatagtgagt cgtatta 417

15

<210> 77

<211> 927

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

20

<400> 77

aggtaaatgc tcaacatgaa ggtgctagtg ttactctcgg tactatctgc atttcttgtt 60  
tgccaaacat caggtgcgga aaaacgggtc gtttgattatt tcgccagttg gaccatttat 120  
agagcaagaa aaggtgcttt cgatgtcagt aatatagatc catcgtgtg tacacacatt 180  
aattttgctt tccttggctc taatgaagat gtttctattc acattttgga ttctggggag 240  
tcaagtgatg ctggtggtca tgagggtttt aaacatctcg tagagcttaa aaagaccaat 300  
cctgacctta aggtatgtgt aagtatgggc ggttggaaacg aaggttccaa gcagtattca 360

ES 2 439 696 T3

gcagtagcat cagatccagc aaaaagagta aaacttgacg atgaggtttt agcttttacc 420  
 gaaaattggg gcttcgatgg ttttgatttg gattgggaat atccaggatt acgaggagga 480  
 aacgaaacta ttgataaaga gaattatgac gaacttttga aagctcttag tgacgttctt 540  
 gagcccaaag gataacttact cagtgtagcc actgcaggcg ccggttgaaaa aatcgacggt 600  
 ggatttgacg tctcagttat aaatgagttg gtggatatga ttaacgttat ggtttttgat 660  
 tttcatggag catttgagaa ctttgtagga cacgtttcac cattgttccc agctcaagtt 720  
 gattacgaat atgaagctaa tagtacatac aatgtagaca caggaatcca aactgggata 780  
 ttgagtggtg cagatccgc aaaaataaac ctccgcatg tccactatgg aagaacctat 840  
 accttagctg ataaaaccaa tacttctctt tatgcaaatg ttaccggtgg tggtaataca 900  
 gggccatatt ctgcacaatc tggatat 927

<210> 78

<211> 44

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 78

taatacgact cactataggg agacaacat caggtgcgga aaaa 44

<210> 79

15 <211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia artificial

<400> 79

taatacgact cactataggg agacgggatc tgcaccactc aata 44

25 <210> 80

<211> 912

<212> ADN

ES 2 439 696 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

5 <400> 80

```

taatacgact cactataggg agacgggac tgcaccactc aataatatta aaactactat 60
aaaaatatga ctagttattc agaagattta atcataatct aaaaaagtgc aatacatttt 120
taataaacta tgatttattt atcccgcggt aaacactaaa aacactatat attatacata 180
aagataaatt aatacagtca aatactatta atttattctc tgaagtacgg gccattactt 240
tgtttacatg tttgtatact aacctgtaga acgttattcc tgaagatttt ttattaacat 300
tgcttctgct actgcaacta cgttgagaac aagaagccat tattatgcac tatcacaata 360
tattattaca gtttctataa aagtattaaa aactaaaaa tattcgaag acaacaacg 420
taacaaaca tatacgatct gtcaaaagtg tcacaacaat ctaacgata tggccgaagt 480

gaggtcgttt ttagtcacgt gatgccttct ccatagattc taactcgatg gtgtagacgc 540
aaatagcgac atctgataat aaaatcgtga actaatttcc gaaaccaaat tcagaatttc 600
gctttaatct gtgccttcta agaattgcaa ggcaagacag acgttgataa agatgttaga 660
tataagtttg atataagtag atataagttt gattattact tacaataggg acagcatcta 720
attatthtta gcacactcac ttgctgcaa caatactggc cgcaaaacta ggtaatagag 780
aaatagtgta tattaaggaa tgaactgact ggtcgcaagc tcttgcttgt cggacctttc 840
cttacgaagt tgcttgacga ctgtattatt tttccgcacc tgatgtttgt ctccctatag 900
tgagtcgtat ta 912

```

10 <210> 81

<211> 342

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

15 <400> 81

```

ggagcgaag catctctctc catcccgacc tctcgtggcc gccgcgaaga aaaggagctt 60
atcatggctt caaacgtat cctgaaggaa ctgaaggact tgcagaaaga tcctccgaga 120
tcatgcagtg caggtccttc tggcgaggat atgttccatt ggcaggcaac aattatgggt 180
cctcctgata gtcctatgc tggaggtggt ttcttagtga atatccattt cccccggac 240
tacccttca agcctccgaa ggtatcgttc aagacaagg tcttccatcc gaacatcaat 300
agcaatggag gcatatgcct cgacattctg aaggagcaat gg 342

```

<210> 82

ES 2 439 696 T3

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 82

taatacgact cactataggg agactctcca tcccgacctc tc 42

10

<210> 83

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 83

20

taatacgact cactataggg agatgcctcc attgctattg at 42

<210> 84

<211> 344

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

30

<400> 84

taatacgact cactataggg agactctcca tcccgacctc tcgtggccgc cgcaagaaa 60

# ES 2 439 696 T3

```

aggagcttat catggcttca aaacgtatcc tgaaggaact gaaggacttg cagaaagatc 120
ctccgagatc atgcagtgca ggtccttctg gcgaggatat gttccattgg caggcaacaa 180
ttatgggtcc tcttgatagt ccctatgctg gagtggtttt cttagtgaat atccatttcc 240
ccccggacta ccccttcaag cctccgaagg tctcgttcaa gacaaaggtc ttccatccga 300
acatcaatag caatggaggc atctcctat agtgagtctg atta 344

```

<210> 85

<211> 674

<212> ADN

5 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 85

```

tcggcggcgg gtaaggaact ttaaaccgga atgggtcaaaa aacaaaatcc tggcataatg 60
gggaaaattg gaattaacgg ttttggccga attggccgcc tggtaacccg tgcagctctt 120
gaaaaaggag ttgaagtagt agctgtcaac gatcccttcc ttgatgtcga ctacatggta 180
tacttgttca aatttgactc taccacgggt cgctacaagg gatgtgtcaa cagtgatggc 240
aaaaacttag ttgttgatgg caaagtcatt tccgtacacc aagaaagaga cccagctgct 300
attccatggg gcaaagctgg tgcagattat gtagtagaat ctaccggagt gttcaccaca 360
attgaaaagg ccaagaaaca tcttgacggg ggtgctaaga aagtcatcat ctacagctcca 420
tctgctgatg ctccaatgta tgtatgtggt gttaacttgg atgcctacaa tccagctgat 480
cccgtaatct ctaacgcttc ttgcactacc aactgccttg ctccaactgc caaagtcatc 540
cacgacaact tcgaaatcgt tgaaggtttg atgaccaccg tacatgccac aaccgccaca 600
caaaaaactg tcgacggacc ctctgaaaaa ttgtggcgtg acggtcgtgg tgccggacaa 660
aacatcatcc cagc 674

```

10

<210> 86

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 86

20 taatacgact cactataggg agagtacccc gtcagctct tgaaa 45

<210> 87

<211> 45

ES 2 439 696 T3

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia artificial

<400> 87

taatacgact cactataggg agaggttg gcatgtacgg tggc 45

10 <210> 88

<211> 538

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia artificial

<400> 88

```

taatacgact cactataggg agagtacccc gtgcagctct tgaaaaagga gttgaagtag 60
tagctgtcaa cgatcccttc cttgatgtcg actacatggt aacttgttc aaatttgact 120
ctaccacggt tcgctacaag ggatgtgtca acagtgatgg caaaaactta gttgttgatg 180
gcaaagtcac ttccgtacac caagaaagag acccagctgc tattccatgg ggcaaagctg 240
gtgcagatta tgtagtagaa tctaccggag tgttcaccac aattgaaaag gccaaagaaac 300
atcttgacgg tgggtgctaag aaagtcacca tctcagctcc atctgctgat gctccaatgt 360
atgtatgtgg tgtaacttg gatgcctaca atccagctga tcccgtaatc tctaacgctt 420
cttgactac caactgcctt gctccactcg ccaaagtcac ccacgacaac ttcgaaatcg 480
ttgaagggtt gatgaccacc gtacatgcca caacctctcc ctatagtgg tctgtatta 538

```

20

<210> 89

<211> 551

<212> ADN

25 <213> Diabrotica virgifera

<400> 89

# ES 2 439 696 T3

```

atagaagttg aaccatctga tactattgag aatgtgaaag ctaagatcca agataaggaa    60
ggtatcccac cagaccagca aagattgac tttgcaggta aacagctgga agatggtaga    120
accttgtctg actataacat ccagaaagag tccactcttc acttgggtact gagattgaga    180
ggaggtatgc agatcttcgt caagacacta actggaaaga ccatcacttt ggaagttgaa    240
ccatctgata ccattgagaa tgtcaaagct aagatccaag ataaggaagg tatcccacca    300
gatcagcaaa gattgatctt tgcaggtaaa cagctagaag atggtagaac tttgtctgat    360
tataacatcc agaaagagtc cactcttcac ttggtactta gattgagagg aggtatgcac    420
atcttcgtca agacattgac tggtaatacc atcacattag aagttgaacc atctgatact    480
attgagaatg tgaaagctaa gattcaagat aaggaaggta tcccaccaga tcagcaaaga    540
ttgatctttg c                                                              551

```

<210> 90

<211> 40

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 90

taatacgact cactataggg agagtatccc accagaccag 40

<210> 91

15 <211> 47

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia artificial

<400> 91

taatacgact cactataggg agaatgtgca tacctcctct caatcta 47

25 <210> 92

<211> 407

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 439 696 T3

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 92

5

```

taatacgact cactataggg agagtatccc accagaccag caaagattga tctttgcagg      60
taaacagctg gaagatggta gaaccttgtc tgactataac atccagaaag agtccactct      120
tcacttggtg ctgagattga gaggaggtat gcagatcttc gtcaagacac taactggaaa      180
gaccatcact ttggaagttg aaccatctga taccattgag aatgtcaaag ctaagatcca      240
agataaggaa ggtatccac cagatcagca aagattgatc tttgcaggta aacagctaga      300
agatggtaga actttgtctg attataacat ccagaaagag tccactcttc acttgggtact      360
tagattgaga ggaggtatgc acattctccc tatactgagt cgtatta                      407

```

<210> 93

<211> 401

10

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<220>

<221> misc\_feature

15

<222> (369)..(369)

<223> n e s a , c , g , o t

<400> 93

20

```

gtaatgttca tgttttgtgt gtagaaaaac gctaaaactg tgtgcaggca catcctttcg      60
cgatgagtag acccaacaca aactgttttc aagtcttacc gaacaatagc agatggctat      120
cgacacaaga ttctggaatt tttcccaaac gtcacactga ctactatgta tttaatatgg      180
gaagacagga agtgtttagtg gaaggatggt ggggaacaaa actgggatgg actggggttt      240
tggatggagt gaacctggcg cctggcaatg gttacagaat tgtagtcagt gataaacat      300
attttgtaac agctgtgaaa ataacaaata aaacaactgt aagggtcttc atgcattggt      360
ctgagatana cggttatcct ctgaggagtc aaggaactga c                               401

```

<210> 94

<211> 45

<212> ADN

25

<213> Artificial

ES 2 439 696 T3

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 94

5 taatacgact cactataggg agatcgcat gagtagaccc aacac 45

<210> 95

<211> 46

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

15 <400> 95

taatacgact cactataggg agaacaatg catgagagcc cttaca 46.

<210> 96

<211> 348

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

25

<400> 96

```
taatacgact cactataggg agacgcgat agtagacca acacaaactg ttttcaagtc 60
ttaccgaaca atagcagatg gctatcgaca caagattctg gaatthttcc caaacgtcac 120
actgactact atgtatttaa tatgggaaga caggaagtgt tagtggaagg atgggtggga 180
acaaaactgg gatggactgg ggttttgat ggagtgaacc tggcgcctgg caatggttac 240
agaattgtag tcagtgataa accatatttt gtaacagctg tgaaaataac aaataaaaca 300
actgtaaggg ctctcatgca ttgtttctcc ctatactgag tcgtatta 348
```

30 <210> 97

<211> 1168

ES 2 439 696 T3

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia artificial

<400> 97

```

acgctgacaa gctgactota gcagatcacc gtcttcgata ccaagcggcc tgaattcgcg      60
tgaatcgtat ctcagtcctat cgttggccaa gccggagtcc aaataggtaa tgccctgctcg    120
ggagttgtac tcgcctggaa cagggcatcc aacctgacgg tcagatgcca tcagacaaga      180
ctgttgaggg aggagatgac agtttcaaca cattcttcag tgaactggt gccggcaaac      240
atgtacctag agcagtatct gtagatttgg aaccaacagt agtagatgaa gtacgtaccg      300
gcacataccg tcaattgttc caccagaac aactcatcac tggcaaagaa gatgccgcca      360
ataactacta gaggtcacta tacaattggt aaagaaatag ttgacttggg attggacaga      420
atccgtaaat tggctgatca atgccatagt caacagatag acgttccatc aacaaagaag      480
tgaaccagaa tccagtacca ccaccgaag agtgaagat caagaaacct tgaagtccag      540
tacattgatc agccaattta cggattctgt ccaatacca gtcaactatt tctttacca      600
ttgtatagtg acctctagta gttattggcg gcactctctt tgccagtgat gagttgttct      660
gggtggaaca attgacggtt tgtgccggtt cgtacttcat ctactactgt tggttccaaa      720
tctacaataa ctgctctagg tacatgtttg ccggcaccag tttcactgaa gaatgtgttg      780
aaactgtcat ctccctctcc aacagtcttg tctgatggca tctgaccgtc aggttggtatg      840
ccctgttcca ggcgagtaca actcccgagc aggcattacc tatttgact ccggcttggc      900
caacgatgga ctgagatagc attcaccgat tttggttgat gagtttttaa cttttacacc      960
acaaatgaaa caaaattacg acagacgttc agattagcta gtaatgcagc ggatccgatc    1020
gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcatga     1080
ttatcatata atttctgttg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgatga     1140
cgttatttat gagatggggt tttatgat                                     1168

```

10

<210> 98

<211> 2131

<212> ADN

15 <213> Diabrotica virgifera

<400> 98

ES 2 439 696 T3

tcgcgcgac acacaccct ctaaacacgc tatcattggt cccacgcgcc gctagctagc 60  
gatcgcgagc gagcgcccgc cccccgcgcc gggaagctgc attactagct aatctgaacg 120  
tctgtcgtaa ttttgtttca tttgtggtgt aaaagttaa actcatcaac caaaatgcgt 180  
gaatgtatct cagtccatgt tggccaagcc ggagtccaaa tcggtaatgc ctgctgggag 240  
ttgtactgcc tggaacatgg catccaacct gacggtcaga tgccatcaga caagactggt 300  
ggaggaggag atgacagttt caacacattc ttcagtgaaa ctggtgccgg caaacatgta 360  
cctagagcag tattttaga tttggaacca acagtagtag atgaagtacg taccggcaca 420  
taccgtcaat tgttccacc agaacaactc atcactggca aagaagatgc cgccaataac 480  
tatgctagag gtcactatac aattggtaaa gaaatagttg acttggattt ggacagaatc 540  
cgtaaattgg ctgatcaatg tactggactt caaggtttct tgattttcca ctcttccggt 600  
ggtggtactg gatctggttt cacttctttg ttgatggaac gtctatctgt tgactatggt 660  
aaaaaatcaa aactggaatt cgccatctac ccagctctc aagtatctac tegtgtagta 720  
gaaccataca actccatctt gaccaccac accactcttg aacctcaga ctgtgccttt 780  
atggtagata atgaagccat ctatgacatc tgcagacgta atctagacat cgagcgccca 840  
acctacacca acttgaacag acttattggc caaatcgat cctcaatcac agcttctcta 900  
agattcgatg gtgctctaaa tgttgacttg acagaattcc aaactaactt ggttccttac 960  
cctcgatttc acttccctct tgtcacctat gccccagtaa tttccgctga aaaggcttac 1020  
catgaacaac tttccgtagc tgaatcacc aatgcctggt tcgaaacctgc caaccagatg 1080  
gtaaatgtg atcccagaca tggtaatac atggcttgct gtatggtgta cagaggggat 1140  
gttgtagcaa aggatgtaaa tgctgctatt gcaaccatta agaccaaaag taccatccaa 1200  
ttcgtagact ggtgtccaac tggtttcaaa gtaggtatca actaccaacc accaactggt 1260  
gtacctggag gtgatttggc taaagtacaa cgtgcccgtat gcatggtgtc caactacata 1320  
gctattgctg aagcctgggc aagattggac cacaaattcg atcttatgta tgccaagaga 1380  
gctttcgtcc actggtatgt aggagagggt atggaagaag gtgaattctc tgaagctcgt 1440  
gaagatttgg ctgctttgga gaaagattat gaagaagttg gtatggactc cggagaaggt 1500  
gaggggtaag gagctgaaga atattaaatt tgattccaaa catgacaaat cacttgtttt 1560  
taagacaaaa aattcctttc aattttttta cactttttca ttacttttct gtgaaacgat 1620  
tatttaaagt ctgatttaat ttaatacaga attttttacg agcaaaaaaa aaaagggcg 1680  
gccccgatt ggcgatatag ctacattaaa gatcgtggcc tctgtctaga gactgactac 1740  
aagtatccat gattaaacgg agactgcaaa cagtgtaatc tcggttatca ataaccatcc 1800  
aatgaactag tgcatgctgt agtatcataa cacgaagtaa gcatcttcac ttgaggaatg 1860  
tattatactg tgtgagccaa tatcagtatg tgacaacact aatgagact ggccatagat 1920  
aaaacctaca ggccttttag gacgacttcc tatactagaa tccggtggaa aaccagtcc 1980  
tcaaagcact gctatctgca ggcactctgc taacgtatgc aatcttggt ggtaaagacg 2040  
caaaggtaaa tcttgttata tatattgctg atcaagcgta tgatgatatg aagaaaceta 2100  
tgggcgaata catgagatac agggatgaaa g 2131

<210> 99

5

<211> 1720

<212> ADN

ES 2 439 696 T3

<213> Diabrotica virgifera

<400> 99

gacacgggcc cgaatatccc cggccgctct ctacgatcaa cgcacogaag agagcgttct 60  
 gtgttttcta gtaatagtta tttataacat tttataaatc aaaatgaggg aaatcgttca 120  
 catccaagct ggacaatgcg gtaaccaaat tggagccaaa ttctgggaaa tcctctctga 180  
 tgaacacgga atcgaccca cggagccta ccatggagac tctgacctcc aacttgaaag 240  
 aatcaatgtc tactacaacg aggcctccgg cggaaaatac gtaccccgcg ccatcctcgt 300  
 cgacttgaa cccggtacca tggattcagt aaggtcgggt cccttcggac aaatcttcag 360  
 accagacaac ttcgtgtttg gacagtctgg agctggaaac aactgggcca agggacatta 420  
 cacagaaggt gctgaattag ttgattcagt attagatggt gtaaggaaag aagctgaatc 480  
 atgtgattgt ttacaaggat tccaactcac aactcactt ggaggtggta ctggatcagg 540  
 tatgggtacc ctcttatct caaaaatccg tgaagaatac ccagacagaa ttatgaacac 600  
 atactcagta gtcccctcac ccaaagtatc agataccgta gtagaacat acaatgccac 660  
 actttcagta catcaattgg tagaaaacac agatgaaaca tactgtattg ataatgaagc 720  
 tctctatgac atttgctca gaactttgaa actcacaaca cccacatatg gagacttaaa 780  
 ccatttggt tccctcaca tgctccggtg aaccacctgt cttaggttcc caggctcagtt 840  
 gaatgctgat cttagaaaat tggtctgcaa catggttccc ttccccgctc tccacttctt 900  
 catgcccgga ttcgctccac tcacctcaag aggcagccaa caatacagag cgttgacagt 960  
 tccagagctc acacagcaaa tgtttgatgc caagaacatg atggcggctt gtgatcccag 1020  
 acacggaagg taccttacag tagctgcagt attcagaggt aggatgtcaa tgaagaaggt 1080  
 tgacgaacag atgctcaaca tccagaacaa gaacagcagc tacttcgctc aatggatccc 1140  
 caacaacgtt aaaacagccg tttgtgatc cccaccaaga ggtctcaaga tgtctgccac 1200  
 5 tttcatcggc aactcaaccg ccatccaaga attgttcaaa cgtatctccg aacaatttac 1260  
 agctatgttc aggaggaaag ctttcttgca ttggtacacc ggagaaggta tggatgaaat 1320  
 ggaattcacg gaagcagaat ccaacatgaa cgacttggtc tcagaatacc aacagtacca 1380  
 agaagccaca gctgacgaag atgccgaatt cgacgaagac caggaagccg aagtcgacga 1440  
 gaactaaatt tcatacgtta attttggatc tgaatcaaa gctttataac ttttatattt 1500  
 gtctcctctc cttttatfff ttatttaagc atgttttttg tacagtctct acattccgct 1560  
 ttgtaaattt cgaatacact acttaatta ttccaagact gactttttgt tgcttggttt 1620  
 tctggaattt caggaagtgt ttagatattt aacatgtttt gcgaactggt tttttatgaa 1680  
 taggcattaa aactgctgcc attacttata ctacagggca 1720

<210> 100

<211> 1175

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

10

ES 2 439 696 T3

<400> 100

```

tgacaactga cacacgagaa gatacgacat ggcaagaaaa tctctctgat taccattctg      60
acttttctgc gggatcggat gaggataagg aagacgatga tttcogatgag aagaacgacg      120
ccgatttaag cagaaggagt cgaagaaaga tggaaaggaa agacgagaag gatcgtcctt      180
taccaccggt actagccaga gttggcggca atattgaagt actcggtttt aatgccaggc      240
agcgtaaagc gttccttaat gctattatgc gctacggaat gccaccacaa gacgctttca      300
attcacagtg gctggtgaga gatcttcgag gaaaatctga gaagatattc aaggcttacg      360
tgtctctctt tatgaggcat ctttgcgaac ctggtgcaga taatgctgat acatttgcgg      420
acggtgtgcc gagggaagga ctgagtaggc aacatgtttt gacaaggatt ggtgtgatgt      480
cacttataag aaagaaggtt caggagttcg aacacatcaa cgccgagtat agcatgccgg      540
aagtaatcaa aaagagcatt atggatcaaa ataaaatcaa tgccgccggc accgccacca      600
caagcgaagc agaaacgcct aaaagtgcta ctaccagtac tagtgctacg ccagctacaa      660
gtgctgctcc cagtcccgct cccacacaag gagaagataa agataaggat aaagattccg      720
ttcagagtga cgaaaataaa gataaagaag tggtaataa aacggaaacc gaagatgaag      780
agaagaaaac gggagaatct tcaacagaaa agccgaaaac tgaaccggaa gaagtgaag      840
aagcttctcc gaaaaccgaa attcccgaag ctagtccga agctgataaa tctgagatca      900
aatccgaagt cgatacctcg tctgtaacca gcgaggaaaa gaaagaagag aaagaggaag      960
aggccaaaaa ggaagaacc gaagagacca aaatggaaat acaggaggag gaacttgta      1020
aagaggagaa aaaagaagaa gaggatgata agaagaagga gaaattaag aaagaggtg      1080
aaaagaagga agaggatgac gttatggta ttgatgatga taaagataag aaggacaaaa      1140
aggaaatcga tctcgaagcc aagaagcgtt tcatg      1175
    
```

5 <210> 101

<211> 1176

<212> ADN

<213> *Diabrotica virgifera*

10 <400> 101

ES 2 439 696 T3

cccatgcggc cgcccatttt tattgagcaa attgttcaga aagttgctgg gcgtagtcgg 60  
 gaaaaacatt gtttaaatcc ctttaatttc ctctaagtcg aaagaaaaag gctcaaaatg 120  
 gctctcagcg acgcagatgt acaaaagcag atcaagcaca tgatggcttt cattgagcaa 180  
 gaagccaatg aaaaggccga gaaattgat gcaaaggctg aagaagaatt caacatcgaa 240  
 aagggccgtc tggccaaca acagaggctc aagattatgg agtactacga gaaaaagag 300  
 aagcaagtag aactccagaa aaaaatccaa tcatcaaca tgttgaacca ggcaagattg 360  
 aaggtattga aagtaaggga agaccatgta cgtgccgttt tggaagatgc tcgcaaacgt 420  
 cttggtgagg taaccagaga ttcaggcaaa tatacaaaa tcctggaaag tctcatcctc 480  
 caagggctct atcagctctt cgaagagac atcaccatta gagtacgcc tcaggacaga 540  
 gaattggtaa aatctatcat gcctaacgct tcccaaaagt acaaggacat aaccggtaaa 600  
 gacgtaaatc taaaaatcga cgacgagagc cacctttctc aagaaaccac cggaggaatc 660  
 gaactgttgg ccttgagaaa caagatcaaa atcaacaata ctctggaagc ccgtcttgag 720  
 ctcatctcac aacaattgat tcccagatc cgtaatgctc tgttcggacg caacgtcaac 780  
 agaaaattca ctgattaagt attttttga tactgtgtat tgcctgtatt ttatatagta 840  
 ttgtaaaaca ttgttggtg cttagacaga tcttcaaaa ccttttaaac tactatgtat 900  
 atacgatata tataataaac cattcctttt tttgaagtat tttaaacagt taagtttgtt 960  
 gttaccctaa ttgtatcctt gtcaagcaga tattttttaa aatccttaga aaattattag 1020  
 gtttcagtta tactacctta tttttttct caaatatatt catattttat gtttatatgt 1080  
 atataaaaa attatttttt tctgtgaga aaatcatcgc aataaaattt attgttagtc 1140  
 caacaaaaaa aaaatggtgg ccgctttgtt ttttat 1176

<210> 102

<211> 2410

5

<212> ADN

<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 102

cggacgcgtg ggggagaac ataacatcca tccacaaata tgtcgaagt aaggatcgga 60  
 gatgaagaga aggaaggca gtatggttat gtccatgctg tctcaggctc agtcgttact 120  
 gctgagaaaa tgtctggctc tgctatgtac gaactggtac gtgtcggata ctatgagctg 180  
 gtaggagaaa tcattagatt ggaagggtac atggctacta ttcaggata cgaagaaaca 240  
 tcagggtgaa ctgttggtga tccagtatta agaactggta aaccactttc agtagaactt 300  
 ggacctggtg ttatgggttc catttttgat ggtatccaac gtccattgaa agacatttgt 360  
 gacgctactg atagtattta catcccaag ggtattaacg taccttcttt atcgagaaca 420  
 gcaaaatggg acttcaacc aatcaacatc aagttgggat ctcaactaac tggagggtgat 480  
 atatatggtc tagttcatga aaacaccctt gtcaaacaca aaatgattct gcctcctaga 540  
 gctaagggtg ctgtaacctg cattgcagaa ccaggaaact aactggtgga tgaagtagta 600  
 ttggaactg aatttgatgg tgatcgtacc aaatatacta tgttgcaagt atggcctgta 660  
 cgtaagcaa ggccagtcag tgaaaaatta cctgccaacc atcctctgct tacaggacag 720

10

ES 2 439 696 T3

cgtgtacttg atgctctttt cccatgtgta cagggtggtta ctactgccat tcccggagct 780  
 ttcgggttggtg gaaaaactgt aatttcacaa tctctttcca aatattccaa ctctgatgtc 840  
 attatctacg tcgggttcgg agaaagaggt aacgaaatgt ctgaagtatt gagagatttc 900  
 cctgaattga ctggtgaaat tgacgggcac actgaatcta ttatgaaacg taccgcattg 960  
 gtcgccaaca catctaacat gctgttagct gctcgtgaag cttctatcta tactggtatt 1020  
 actctttctg aatacttccg tgatatgggt tacaacgtat ctatgatggc tgactcgaca 1080  
 tcacgttggg ccgaagcttt gagagaaatt tcagggtcgtt tggctgaaat gcctgccgat 1140  
 tccggttatc cggcttactt aggtgcccg tggcttcct tctacgaacg tgctggtcgc 1200  
 gttaaatggt taggtaatcc agacagagaa ggatccggtt caattgtagg agccgatca 1260  
 cctcctgggtg gtgatttctc agatcctggt accactgcta ctcttggtat tgtacagggtg 1320  
 tctcggggtt tggacaagaa acttgcccaa cgtaagcact tcccttcagt agactggctt 1380  
 ggatcatatt ccaaatattt aagagcattg gacgactttt atgacaaaaa cttccaagag 1440  
 tttattctc ttagaaccaa agttaaggaa attcttcagg aagaagatga tctagccgaa 1500  
 attgtgcagc tggtaggtaa agcatctctg gcagaaacg acaaatcac cttggaatt 1560  
 gccaggcttc ttaaagaaga tttcttgcaa caaaactcat actcttctta tgacagattc 1620  
 tgtccattct ataaaactgt cggtatggtg agaaacatga tcggtttgta cgacatggcg 1680  
 agacacgctg tagaatcaac cgcacaatca gaaaataaga tcacttgtaa cgtaataaga 1740  
 gattcaatga gtggaatttt atatcaactt agcagtatga aatttaagga tcccgtaaaa 1800  
 gatggtgaag ctaaatcaa ggcagatttt gatcaattat atgaagatat tcagcaggcc 1860  
 ttcagaaact tagaagatta aatcttttta aggaaatttt cctattttgt tcatcagtgt 1920  
 aagtttaaaa atatagcgat atttatcaaa aagaataata aggcctctat cctcacttc 1980  
 tgtgaatatt aatatggccg tactaaagat agtaactaaa gataggtttt ctcttttttg 2040  
 atattatcct gtacaaaata aattatgtaa attggtgaat atgtgtatag tttttttggg 2100  
 tgagggtaca gtgcttatta aatacttttt aaacattttt cccgccatc caattactat 2160  
 taagtttttt cgttttaata cttttttaaa tatacagggtg cttaatatcg tttatatattt 2220  
 cagtattact tggttttctt catgtaaatt gttttaaatt tttcttttac ctttttaatc 2280  
 ttgtatatta cattacccaa ttaaagttaa ttgtacagat taagataaac gagtatctta 2340  
 taacatctat tagattgta gaatcaataa atgtagtgtta attgttctgt tttgaacaaa 2400  
 taaatgcatc 2410

<210> 103

<211> 1575

5

<212> ADN

<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 103

atctgacagt ttctacagta tagttgcagt gttcagtgga aaatattcaa ttaagatatt 60  
 cctagcgttc agacgtgtgc tctgatttca tggactaaa atggcagtag ttcaatcaaa 120

10

ES 2 439 696 T3

ttacattcaa aatatacctt cttttggatg tgtagacca cctgacaacg gtcctaaaac 180  
aacaagagaa tcatttagtag aagtgtcttc atcacgtcca cgccaagaag actactcagt 240  
atatgagaac agactggcat ctttactaa ctggccaac acccaagtgt caagagaatc 300  
attagctcga gctggtttta tatatacagg tcaagatgac atcgttatct gccctatttg 360  
taagatagag ggataccatt gggatcagg agacaatcca atggatgac atcgtgtttg 420  
gaatcccaac tgccccttc ttaatagaag agataacatc gagcacgac actctgtagg 480  
ttctagagac acttgtggac tttttggcat agaattgta ccaaattcag ttctgaaga 540  
taatacaagt aatttcaaaa aattaggat ccaacctgga acaggtccac aaaatcaaga 600  
caaaattacg ttagaaagcc ggttagcaac attccagggt tggccaaaga gcattaaaca 660  
gaggccttct gagtttagctg aggcgggatt ttattacaca ggagctggg accaaaactgt 720  
gtgcttttat tgtggtggg gattaaaaga ctgggatgaa ggagatgac ctgggagca 780  
acatgccctt tggtttagca aatgtgtgtt tctcaattg aaaaaggga aagaattcat 840  
cgatcaagta aagaggaagg ctgatccaca attttcaatt cctggaccta gcggtactca 900  
agccaaagag gaaccgactg ctactgaatc ttcaagtgt aaacaaagt aaacagtga 960  
aacaaaatca gatagggaaa gtttcgcaac tgacacaact ttgtgcaaaa tttgcttta 1020  
aaacgaactt ggtgttgtt tcttgcttg tggacatatt gttgcttg tagattgtgc 1080  
tgctgacta aaaacatgtg ctgtatgccc aaaacctta gaggcacag tcagagcgtt 1140  
cctatcataa atttttatc tgttaatagt tttcacatt tcatgttca cacatactta 1200  
gatctagtca agattgttag agttttgca aagaaattaa ataaaaattc tttcataaa 1260  
aatcatttct ttaatattac attagagaaa aattatatt ttatactgag taaaaattg 1320  
aacaagttat taattttaag ttacaaaata cgcttttata ggtaacaat tatcaaagc 1380  
cttaaatcta atagatacta cacaacatta aggactgcaa accatatct tcacgaagta 1440  
atccctacta gtgaccaatt gctcgtagg agcagatgca aattacaca atttactata 1500  
aatctgacat taaaacttag gtgtatgtt gtgtgtatgt tatgtattga tcataataat 1560  
atagtaattt ataataat 1575

<210> 104

<211> 1870

5

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 104

gtcgaccac gcgtccgaat ttgatggtga tcgtaccaa tatactatgt tgcaagtatg 60  
gctgtacgt caagcaaggc cagtcagtga aaaattacct gccaacatc ctctgcttac 120  
aggacagcgt gtacttgatg ctctttccc atgtgtacag ggtggtacta ctgccattcc 180  
cggagcttcc ggttgtggaa aaactgtaat ttcacaatct ctttccaaat attccaactc 240  
tgatgtcatt atctacgtcg gttgcggaga aagaggtaac gaaatgtctg aagtattgag 300  
agatttccct gaattgactg ttgaaattga cgggcacact gaatctatta tgaaacgtac 360  
cgcattggtc gccaacacat ctaacatgcc tgtagctgct cgtgaagctt ctatctatac 420

10

ES 2 439 696 T3

tgggtattact ctttctgaat acttccgtga tatgggttac aacgtatcta tgatggctga 480  
 ctogacatca cgttgggccg aagctttgag agaaatttca ggctgtttgg ctgaaatgcc 540  
 tgccgattcc ggttatccgg cttacttagg tgcccgtttg gcttccttct acgaaactgc 600  
 tggctgcggtt aaatgttttag gtaatccaga cagagaagga tccgtttcaa ttgttaggagc 660  
 cgtatcacct cctggtggtg atttctcaga tcctgttacc actgctactc ttgggtattgt 720  
 acaggtgttc tggggtttgg acaagaaact tgcccaactg aagcacttcc cttcagtaga 780  
 ctggccttga tcatattcca aatatttaag agcattggac gacttttatg acaaaaactt 840  
 ccaagagttt attcctctta gaaccaaagt taaggaattt cttcaggaag aagatgatct 900  
 agccgaaatt gtgcagctgg taggtaaagc atctctggca gaaacggaca aaatcacctt 960  
 ggaaattgcc aggcttctta aagaagattt cttgcaaca aactcact cttcttatga 1020  
 cagattctgt ccattctata aaactgtcgg tatgttgaga aacatgatcg gtttgtacga 1080  
 catggcgaga cacgctgtag aatcaaccgc acaatcagaa aataagatca cttggaactg 1140  
 aataagatg tcaatgagtg gaattttata tcaacttagc agtatgaaat ttaaggatcc 1200  
 cgtaaaagat ggtgaagcta aaatcaagc agattttgat caatttatg aagatattca 1260  
 gcaggccttc agaaacttag aagattaaat ctttttaagg aaattttcct attttgttca 1320  
 tcagtgttag tttaaaaata tagcgatatt tatcaaaaag aataataagg cctctatccc 1380  
 tcaacttctgt gaatattaat atggccgtac taaagatagt aactaaagat aggttttctc 1440  
 ttttttgata ttatcctgta caaaaataat tatgtaaatt gttgaatatg tgtatagttt 1500  
 ttttgggtga gggtagcagtg cttattaaat actttttaaa catttttccc gccattccaa 1560  
 ttactattaa gttttttcgt ttttaactt ttttaaatat acaggtgctt aatatcgttt 1620  
 atattttcag tattacttgg ttttcttcat gtaaattggt ttaaattttt cttttaccct 1680  
 tttaatcttg tatattacat tacccaatta agttaattg tacagattaa gataaacgag 1740  
 tatcttataa catctattag attgttagaa tcaataaatg tagtgtaatt gttctgtttt 1800  
 gaacaaataa atgcatcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaggaaaaa aaaaaaaaaa 1860  
 gggcggccgc 1870

<210> 105

<211> 24

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 105

ctaatagatg ttataagata ctcg 24

<210> 106

15

<211> 24

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 106  
 cgagtatctt ataacatcta ttag 24  
  
 10 <210> 107  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 107  
 gtaataactga aaatataaac gat 23  
 20  
 <210> 108  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 25  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 108  
 30 atcgttata ttttcagtat tac 23  
  
 <210> 109  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 109  
 5 agcactgtac cctcacccaa 20  
  
 <210> 110  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 15 <400> 110  
 ttgggtgagg gtacagtct 20  
  
 <210> 111  
 <211> 21  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 25  
 <400> 111  
 gtgagggata gaggccttat t 21  
  
 <210> 112  
 30 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 35 <223> Secuencia artificial

# ES 2 439 696 T3

<400> 112  
aataaggcct ctatccctca c 21

5 <210> 113  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Secuencia artificial

<400> 113  
aacttacct gatgaaca 19

15 <210> 114  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Secuencia artificial

<400> 114  
ttgttcatca gtgtaagtt 19

25 <210> 115  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Secuencia artificial

<400> 115  
35 aggcctgctg aatatctca 20

<210> 116  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
5  
<220>  
<223> Secuencia artificial  
<400> 116  
10 tgaagatatt cagcaggcct 20  
<210> 117  
<211> 21  
<212> ADN  
15 <213> Artificial  
<220>  
<223> Secuencia artificial  
20 <400> 117  
ctgccttgat ttagctca c 21  
<210> 118  
<211> 21  
25 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Secuencia artificial  
30 <400> 118  
gtgaagctaa aatcaaggca g 21  
<210> 119  
35 <211> 20

<212> ADN  
<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia artificial

<400> 119  
gattgtgCGG ttgattctac 20

10 <210> 120  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia artificial

<400> 120  
gtagaatcaa cgcacaat 19

20 <210> 121  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>

<223> Secuencia artificial

<400> 121

30 taatacgact cactataggg tacgtaagct tggatcctct aga 43

<210> 122  
<211> 44  
<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 122

5 taatacgact cactataggg tgcaggtacc ggtccggaat tccc 44

<210> 123

<211> 41

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

15 <400> 123

taatacgact cactataggg cgcgtccgaa tttgatggtg a 41

<210> 124

<211> 41

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

25

<400> 124

taatacgact cactataggg gttacctctt tctccgcaac c 41

<210> 125

30 <211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Secuencia artificial

# ES 2 439 696 T3

<400> 125  
taatacgcact cactataggg gaagtattga gagattccc t 41

<210> 126  
5 <211> 41  
<212> ADN .  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Secuencia artificial

<400> 126  
taatacgcact cactataggg ggaatcggca ggcattcag c 41

<210> 127  
15 <211> 41  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
20 <223> Secuencia artificial

<400> 127  
taatacgcact cactataggg gcttacttag gtgcccgttt g 41

<210> 128  
25 <211> 40  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
30 <223> Secuencia artificial

<400> 128  
35 taatacgcact cactataggg ataaaagtcg tccaatgctc 40

<210> 129  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 <400> 129  
 10 taatacgact cactataggg ccaagagttt attcctcta 40  
 <210> 130  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 20 <400> 130  
 taatacgact cactataggg gctatattt taaactaca c 41  
 <210> 131  
 <211> 40  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 30 <400> 131  
 taatacgact cactataggg gaataataag gcctctatcc 40  
 <210> 132  
 35 <211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5

<223> Secuencia artificial

<400> 132

taatacgact cactataggg taaacgatat taagcacctg 40

10

<210> 133

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 133

taatacgact cactataggg acattttcc cgccattcca 40

20

<210> 134

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 134

30

taatacgact cactataggg gatgcattta ttgttcaa 39

<210> 135

<211> 36

<212> ADN

35

<213> Artificial

# ES 2 439 696 T3

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 135

5 gcgtagaatt cgttcaaac agaacaatta cactac 36

<210> 136

<211> 56

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

15 <400> 136

taatacgact cactataggg gcgtagaatt cgttcaaac agaacaatta cactac 56

<210> 137

<211> 53

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

25 <400> 137

ggcctaagc tagcgcaatt ggatccatt tattgattct aacaatctaa tag 53

<210> 138

30 <211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Secuencia artificial

ES 2 439 696 T3

<400> 138  
ggcctaagc tagcgcaatt ggatcc 26

5 <210> 139  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Secuencia artificial

<400> 139  
gatggtgaag ctaaaatcaa ggcag 25

15 <210> 140  
<211> 53  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Secuencia artificial

<400> 140  
ctgccttgat ttagcttca ccatcgaaa tttcctatt ttgtcatca gtg 53

25 <210> 141  
<211> 608  
<212> ADN  
<213> Diabrotica virgifera

30 <400> 141

ES 2 439 696 T3

gcgtagaatt cgttcaaac agaacaatta cactacattt attgattcta acaatcta 60  
 agatgttata agatactcgt ttatcttaat ctgtacaatt aactttaatt gggtaatgta 120  
 atatacaaga ttaaagggt aaaagaaaa tttaaacaa tttacatgaa gaaaaccaag 180  
 taatactgaa aatataaacg atattaagca cctgtatatt taaaaaagta ttaaacgaa 240  
 aaaacttaat agtaattgga atggcgggaa aaatgtttaa aaagtattta ataagcactg 300  
 taccctcacc caaaaaact atacacatat tcaacaattt acataattta tttgtacag 360  
 gataatatca aaaaagagaa aacctatctt tagttactat ctttagtacg gccatattaa 420  
 tattcacaga agtgagggat agaggcctta ttattctttt tgataaatat cgctatattt 480  
 ttaaacttac actgatgaac aaaataggaa aatttcctta aaaagattta atcttctaag 540  
 tttctgaag cctgctgaat atcttcatat aattgatcaa aatctgcctt gattttagct 600  
 tcaccatc 608

<210> 142

<211> 533

5

<212> ADN

<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 142

ggccttaagc tagcgcaatt ggatcccatt tattgattct aacaatctaa tagatgttat 60  
 aagatactcg tttatcttaa tctgtacaat taactttaat tgggtaatgt aatatacaag 120  
 attaaaagg taaaagaaaa atttaaacaa atttacatga agaaaaccaa gtaatactga 180  
 aatataaac gatattaagc acctgtatat ttaaaaaagt attaaaacga aaaaacttaa 240  
 tagtaattgg aatggcggga aaaatgttta aaaagtattt aataagcact gtaccctcac 300  
 ccaaaaaaac tatacacata ttcaacaatt tacataattt attttgtaca ggataatattc 360  
 aaaaagaga aaacctatct ttagttacta tcttttagtac ggccatatta atattcacag 420  
 aagtgagga tagaggcctt attattcttt ttgataaata tcgctatatt ttaaaactta 480  
 cactgatgaa caaaatagga aaatttcoga tggatgaagct aaaatcaagg cag 533

10

<210> 143

<211> 1114

<212> ADN

15

<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 143

ES 2 439 696 T3

cgtagaattc gttcaaaaca gaacaattac actacattta ttgattctaa caatctaata 60  
 gatgttataa gatactcgtt tatcttaatc tgtacaatta actttaattg ggtaatgtaa 120  
 tatacaagat taaaaggga aaagaaaaat ttaaaacaat ttacatgaag aaaaccaagt 180  
 aatactgaaa atataaacga tattaagcac ctgtatattt aaaaaagtat taaaacgaaa 240  
 aaacttaata gtaattggaa tggcgggaaa aatgttttaa aagtatttaa taagcactgt 300  
 accctcacc aaaaaaacta tacacatatt caacaattta cataatttat tttgtacagg 360  
 ataatatcaa aaaagagaaa acctatcttt agttactatc tttagtacgg ccatattaat 420  
 attcacagaa gtgagggata gaggccttat tattcttttt gataaatatc gctatatttt 480  
 taaacttaca ctgatgaaca aaataggaaa atttccttaa aaagatttaa tcttctaagt 540  
 ttctgaaggc ctgctgaata tcttcatata attgatcaaa atctgccttg attttagctt 600  
 caccatcgaa attttctat tttgttcac agtgaagtt taaaaatata gcgatattta 660  
 tcaaaaagaa taataaggcc tctatccctc acttctgtga atattaatat ggccgtacta 720  
 aagatagtaa ctaaagatag gttttctctt ttttgatatt atcctgtaca aaataaatta 780  
 tgtaaatgtg tgaatatgtg tatagttttt ttgggtgagg gtacagtgtc tattaaatac 840  
 tttttaaaca tttttccgc cattccaatt actattaagt tttttcgttt taatactttt 900  
 ttaaatatac aggtgcttaa tatcgtttat attttcagta ttacttggtt ttcttcatgt 960  
 aaattgtttt aaatttttct tttacccttt taatcttgta tattacatta cccaattaa 1020  
 gttaattgta cagattaaga taaacgagta tcttataaca tctattagat tgtagaatc 1080  
 aataaatggg atccaattgc gctagcttaa ggcc 1114

<210> 144

5

<211> 1125

<212> ADN

<213> *Leptinotarsa decemlineata*

<400> 144

10

ES 2 439 696 T3

```

ggtgacatgg ccaccatcca ggtatatgaa gaaacttctg gagtaacggt gggagatcct      60
gtgttgcgta cggtaaaccc tctatctgtg gaacttgggc caggattat gggttccatc      120
tttgatggta tccaacgtcc gctgaaagac atctgcgaca tgacggaaag tatctacatt      180
cccaagggtg tgaacgtgcc ttcactctcc agaactatca aatgggaatt caaccaatc      240
aacatcaagt tgggatccca ctgacaggt ggagatattt atggtatggt ccacgaaaac      300
acccttgta agcacaaaat gatcctccca ccaaaatcta agggaacagt tacatacgtg      360
gcagaaccag gaaactatac cgttgatgaa gttgtattgg aaactgaatt tgatggagaa      420
aggtaaaat aactatggt acaagtctgg ccagttcgac aggcaagacc tgttagtgaa      480
aaactccag ccaatcacc gcttctcaca ggacagcgtg tattggactc tcttttccca      540
tgtgtgcaag gaggaaccac tgctattccc ggtgctttcg gttgtggtaa aactgtaatt      600
tcccagtcac tttccaagta ttccaactct gatgtcattg tgtatgtagg ttgtggagag      660
agaggtaatg agatgtctga agtattgaga gatttcctg aactgactgt ggaattggt      720
ggtgagaccg aatctatcat gaaacgtacc gccttggttg caaacacctc caacatgcct      780
gtcgtgccc gtgaggcttc tttttatact ggtattacc tgtctgaata tttccgtgat      840
atgggttaca acgtttctat gatggctgac tctacatcac gttgggctga agctttgaga      900
gaaatttcag gacgtttggc tgaatgcct gctgattccg gttaccagc ctatttgggt      960
gctcgtcttg cctctttcta tgaacgtgct ggtcgcgtca aatgtttggg taaccctgac     1020
agagaaggat cggtttctat tgtaggagca gtatctccac ccggtgggta cttttcagat     1080
cccgttactt cagcaacttt aggtatcgta cagggtttct ggggt                          1125

```

<210> 145

<211> 1125

5

<212> ADN

<213> *Spodoptera frugiperda*

<400> 145

ES 2 439 696 T3

ggtgacatgg ccaccatcca ggtatacгаа gaaacatcag gcgtaactgt aggtgacccc 60  
 gtgctgcgta ccggcaagcc cctgtccgta gagctcggac ctggtatcct cggetccatc 120  
 tttgacggta tccagcggcc actgaaggac atcaacgagc tcacacagtc catctacatc 180  
 cccaagggtg tcaacgtacc ctgccttgga cgtgatgtct cctgggaatt caacccttg 240  
 aatgtaagg tcggctccca catcaccgga ggagacttgt acggtatcgt acacgagaac 300  
 acattggta agcacaagat gttgatccca cccaaggcca aggttaccgt cacctacgtc 360  
 gcgcccctcg gcaactacaa agtcaactgac gtagtggttg agacggagtt cgacggcgag 420  
 aaggagaagt acacgatgtt gcaagtatgg ccggtgcgcc agccccgccc cgtcactgag 480  
 aagctgcccg ccaaccaccc cctgctcacc ggacagagag tgctcgactc tctcttcct 540  
 tgtgtccagg gtggtaccac ggccatcccc ggcgcccttcg gttgtggcaa gactgtcgtc 600  
 tcacaggctc tgtccaagta ctccaactct gacgtcatca tctacgtcgg atgcggtgaa 660  
 cgtggtaacg agatgtctga ggtactgcgt gacttccccg agctgacggt ggagatcgag 720  
 ggcattgacc agtccatcat gaagcgtacc gcgctcgtcg ccaacacctc caacatgcct 780  
 gtagccgccc gagaggcttc catctacacc ggtatcacc tctctgagta cttccgtgac 840  
 atgggttaca acgtgtccat gatggtgac tccacctctc gttgggcccga ggtctctcgt 900  
 gagatctcag gtcgtctggc tgagatgcct gccgactccg gttaccccgc ctacctggga 960  
 gccgctctgg cctcgttcta cgagcgtgcc ggacgcgtga agtgccctgg taaccccgac 1020  
 agggagggct ccgtgtccat cgtgggcgcc gtgtcgcgcc ccggaggtga cttctccgac 1080  
 cccgtgacgg ccgccacgct gggtatcgtg cagggtgtct ggggt 1125

<210> 146

<211> 1126

5

<212> ADN

<213> Agrotis ipsilon

<400> 146

ggtgacatgg ccaccatcca ggtatacгаа gaaacatcag gtgtaacagt gggcgacccc 60  
 gtactgcgta ctggcaagcc tctgtccgtg gaactgggtc ctggtatcct gggctccatc 120  
 tttgacggta tccagcgtcc tctgaaggac attaacgagc tcacacagtc catctacatc 180  
 cccaagggtg tgaacgtgcc cagtctatcc agggatatcg cctgggaatt tgagcccatg 240  
 aacctgaaga tcgggtccca catcactggc ggagacctgt acgccatcgt ccgcgagaac 300  
 accctggtga agcacaagat gttgatcccg cccaaggcca aggttaccgt cacatacatc 360  
 gcgcccctcg gcaactacca cgtcactgac gtggttcttg agacagagtt cgacggtgag 420  
 aaggagaagt acagcatgtt acaagtgtgg cccgtgaggc agcccggccc ggtcgtgag 480  
 aagctccccg ccaaccatcc gctgctcacc gggcagaggg tactcgactc gctgttcccc 540  
 tgtgtgcagg gtggtacgac ggccatcccc ggagccttcg gttgoggaa gactgtcatc 600  
 tcacaggcgt tgtccaagta ctccaactcc gatgtcatcg tctacgtcgg ttgcggagag 660

10

ES 2 439 696 T3

cgtggtaacg agatgtctga agtactgctg gacttccccg agctgaccgt agagatcggc 720  
 ggcgtcaccg agtccatcat gaagagaacc gcgctggtcg ccaacacatc caacatgcct 780  
 gtcgccgcc gagaggcttc catctatacc ggtatcactc tgcggagta cttccgtgac 840  
 atgggttaca acgtgtccat gatggccgac tccacgtctc gttgggcgga ggcctccgt 900  
 gagatctctg gtcgctggc cgagatgccg gccgactccg ggtaccggc ctacctgga 960  
 gcacgactgg cctccttcta cgagcgagcc ggacgagtca agtgtctggg taaccccgac 1020  
 agggaaggtt ccgtatccat cgtgggccc gtgtctctc ccggcgaga cttctccgac 1080  
 cctgtgacgg ccgcgaccct gggatcgtg caggtgttct ggggta 1126

<210> 147

<211> 1126

5

<212> ADN

<213> Helicoverpa zea

<400> 147

ggtagacacg ccaccatcca ggtatacgag gaaacctcag gtgtaaccgt gggtagcccc 60  
 gtactccgta ccgcaagcc cctgtccgtg gagttggcc ccggtatcct gggctccatc 120  
 tttgacggta tccagcgtcc cctgaaagac attaacgagc tcacacagtc catctacatc 180  
 cccaagggtg tgaacgtacc ctctctggct agggatgtca gctgggaatt cgttcccatg 240  
 aacgttaaga cgggctcca catcaccgga ggagacctgt acggctcgtt gcacgagaac 300  
 acgctggtga agcaccgat gctgatccc cccaaggcca agggtagcgt cacatacatc 360  
 gcgcccgctg gcaactaaa agtcaactgac gtagtgctgg agacggagtt cgacggcgag 420  
 agggagaagt acacgatgtt gcaggtgtgg ccggtgcgcc agcccgggcc cgtcaccgag 480  
 aagctcccc ccaaccatcc gctgctcacc ggacagaggg tgctcgactc actcttcct 540  
 tgcgtacag gttgtacaac tgccatcccc ggagctttcg gttgcggcaa gactgtcatc 600  
 tcgcaggcgc tgtccaagta ctccaactcc gatgtcattg tgtacgtcgg gtgcggagag 660  
 cgtggtaacg agatgtccga agtactgctg gacttccccg agctgaccgt ggagatcgag 720  
 ggcgtgacgg agtccatcat gaagcgaact gccctcgtcg ccaacacctc caacatgcct 780  
 gtcgccgcc gagaggcttc catctacact ggtatcactc tatccgagta cttccgtgac 840  
 atgggttaca acgtgtccat gatggtgac tccacgtccc gttgggcgga agccctgcgt 900  
 gagatctcgg gtcgctggc ggagatgcc gccgactccg gctaccccgc atacctgggc 960  
 gctaggttag cttccttcta cgagagagcc ggacgcgtca agtgtctggg taaccccgac 1020  
 agggaaggtt ccgtatccat cgtgggtgcc gtatctcccc ccggaggtga cttctctgac 1080  
 cctgtaactg cggccacgct gggattgtg caggtgttct ggggta 1126

10

<210> 148

<211> 1126

<212> ADN

ES 2 439 696 T3

<213> *Ostrinia nubilalis*

<400> 148

5                    ggtgacacgg ccaccatcca ggtatacгаа gagacctcag gtgtgaccgt cggatgatccc        60  
 gtgctccгаа cggcaagcc tctgtccgtc gagctgggtc cgggtatcct gggttccata        120  
 ttcgacggca tccagcgccc gctgaaggac atcaacгаа tgacgcagtc catctacatc        180  
 cccaagggag tcaacgtgcc ctgcctggcc aggaaccacg actgggagtt caacccgctt        240  
 aacgttaagg tcggctccca catcacgggc ggagacttgt acggtatcgt gcacgaaaat        300  
 accctggtga agcacaaaat gctgatgccc cccaaggcta aaggcacatc cacctacatc        360  
 gcgcctgccg gcaactacaa cgctactgat gtggtgctgg agacagagtt tgacggcgaa        420  
 aagaactcct acaccatggt gcaagtgtgg cccgtgccgc agcccagacc ctgcactgag        480  
 aagctgcccg ccaaccaccc gctgctaact gggcagcgtg tgctggactc actcttcccc        540  
 tgtgtccagg gcggcaccac cgccatcccc ggcgccttcg gttgcgгaa gactgtcatc        600  
 tcgcaagcgc tgtccaagta ctccaactct gacgtcatcg tctacgtcgg ctgcggagag        660  
 cgtggtaacg agatgtctga ggtactgcaa gacttccctg agctgagcgt ggagatcgac        720  
 ggcgtgacgg aatccatcat gaagcgaca gcgctcgtgg ccaacacctc caacatgcct        780  
 gtggctgccc gtgaggcctc catctatact ggtatcacc c tatccgagta ctccgcgac        840  
 atgggttaca acgtgtcaat gatggcggat tccacatcgc gttgggcgга ggcgctgcgc        900  
 gagatctcgg gccgtctggc cgagatgccg gcggattccg gctacccggc ctacctgggc        960  
 gcccgctgg cctccttcta cgagcgagcg ggacgcgtga agtgtctcgg aaaccccgac        1020  
 agggaaggtt ccgatccat cgtgggcgcc gtgtcgccac ccggaggaga cttctcggac        1080  
 ccggtgacgg cggcgaccct gggatcgtg caggtgttct ggggta                    1126

<210> 149

<211> 1125

10                  <212> ADN

<213> *Anthonomus grandis*

<400> 149

ES 2 439 696 T3

```

ggtgacatgg ccacatcca ggtatatgaa gaaacctcag gtgtaacagt aggcgaccct 60
gtcctaagaa cgggcaaacc tctgtcagta gaactgggac ctggtatcat gggttccatt 120
tttgatggta tccaacgtcc cttaaaagac attaacgact tgaccagtc catttacatc 180
cccaagggtg taaatgtgcc atgtctgtcc aggacagccc agtgggaatt caatcccgtc 240
cacatcaaga tgggttctca ttgaccgga ggcgacatct atggtatggt ccatgaaaac 300
actttggtga aacacaaaat gatTTTgcct ccaaaggcaa agggTactgt gacatatatc 360
gocgaggcag gcaactatac tgtggacgat gtggTacttg agaccgaatt cgacggagaa 420
cgcaccaaat acaccatgTt gcaagtgtgg cccgtacgtc aaccgagacc tgtgagcgaa 480
aaattgoccg ccaaccacc actgctcacc ggacaacgtg tactcgattc acttttccc 540
tgtgtgcaag gaggtaccac cgccatccc ggcgctttcg gttgcggtaa aaccgtaatt 600
tcacaggcct tgtccaaata ttccaactcc gatgtcatca tttacgtcgg ttgcggtgaa 660
agaggtaacg aaatgtctga agtactcgt gacttcccg agttaacggt cgaaatcgac 720
ggtgccaccg aatccatcat gaaacgtacc gctttggtgg cgaacacctc caacatgcc 780

gtggccgcc gtgaggcctc ctttatacc ggaatcactt tgtccgagta tttccgtgat 840
atgggttaca acgtttcgt gatggccgac tccacctcac gttgggccga agccttaaga 900
gaaatttcag gtcgTTTggc tgaaatgcc gccgattccg gttatcccgc ttacttgga 960
gcacgTTTgg cctcgttcta cgaacgtgcc ggtcgcgta agtgtttagg taatccggac 1020
agagagggct ccgtgtccat cgtaggcgca gtatcgccac ctggtggtga cttctcagat 1080
ccgTcactt ccgccacttt gggTatcgta caggTttct ggggt 1125

```

<210> 150

5

<211> 1125

<212> ADN

<213> Tribolium castaneum

<400> 150

10

ES 2 439 696 T3

ggtgacatgg ccaccatcca ggtatacгаа gaaacttcag gtgttacggt gggatgacca 60  
 gtcttacгаа ctggtaaacc cttgtcgggtg gagctgggcc caggattat gggttcgatt 120  
 tttgacggta tccagagacc gctgaaggac atcaacgagc tcacgcaaag tatttacatt 180  
 cctaaggggtg ttaatgtgcc atcgttgctg cgtacgacta agtgggagtt tgccccattg 240  
 aatatcaagt tggggtcaca tctgacaggc ggtgatattt acgggatcgt ccatgaaaac 300  
 actctcgtca agcataaaat gctgctgccg cccaaagcca aggggactgt cacatacgtc 360  
 gccgatcccc gaaattacac agtcgatгаа gtctgtcttg agacggaatt cgacggcgag 420  
 aggaccaaat acaccatggt gcaagtgtgg cctgtgcgtc agccccgcc tgtcagcgag 480  
 aaattgccag ccaatcacc cctattaact ggtcaacgcg tactcgactc acttttcccg 540  
 tgcgtccaag ggggtaccac cgccattccc ggagctttcg gttgtggtaa gaccgtaatc 600  
 tcgcaatctc tctccaaata ttccaactct gacgttatca tttgcgtcgg ttgcggggag 660  
 cgtggtaacg aaatgtctga agtattgcgg gacttccccg aactgacagt cgaaatcgaa 720  
 ggccaaacag agtctatcat gaaacgtacc gctctgtcgc ccaacacctc taacatgect 780  
 gtagecgcgc gtgaggcttc aatttacacc ggtattacac tgtctgagta tttcctgat 840  
 atgggttaca acgtgtcgat gatggccgat tccacctcgc gttgggccga agctttgaga 900  
 gaaatttccg gtctgttagc tgaaatgcc gccgattctg ggtaccccgc gtatttgggg 960  
 gcccgtttg cttcgtttta cgagcgtgca ggcggtgtaaatgcttggg taaccctgat 1020  
 cgtgaagggt cgtttctat tgcgggggcc gtatcgcccc ctggtggtga tttctctgat 1080  
 cccgtcacct cagctacctt gggatcgtc cagggtttct ggggt 1125

<210> 151

<211> 2860

5

<212> ADN

<213> Manduca sexta

<400> 151

ggtcgtctc atccatctt ctcgtctcaa caggacacac agatagtaca aaatggcgag 60  
 caaaggcgggt ttgaagaoga tcgccaatga ggagaatgag gagaggttcg gatcgtgtt 120  
 cgccgtgtcc ggtcctgtcg taacagcgga gaagatgtcc ggtccgcta tgtacgagct 180

10

ES 2 439 696 T3

ggtgcgcgtc ggttacaacg agctgggtggg agaaatcatc cgtcttgagg gtgacatggc 240  
 caccatccag gtatacgagg agacctcagg cgtcacagtc ggtgaccctg tgctgcgtac 300  
 cggaagccc ttgtccgtgg aactcggccc cggtatcctg ggctccatct ttgacggtat 360  
 ccagcgtcca ctgaaggaca tcaacgagct cacacaatcc atctacatcc ccaagggtgt 420  
 gaacgtgccc tcgctcgcca gggaggttga ctgggaattc aacccccctca atgttaaggt 480  
 cggctccac atcacggcg gagacctgta cggtatcgtg cacgagaaca cgctcgtgaa 540  
 gcacaagatg ttgatgccgc cgcgcgcca ggtaccgtc acctacatcg cgcccgccg 600  
 caactacaaa gtcactgatg tagtgttgga gacagagttc gacggcgaga aggcgcagta 660  
 cacgatggtg caggtgtggc cegtgcgtca gcccgtccc gtcaccgaga agctccccgc 720  
 caaccacccg ctgctcactg gacagagagt actcgactcc ctcttcccct gtgtccaggg 780  
 cggtagcact gccatccccg gagccttcgg ttggcgaaa actgtcatct cacaggcgt 840  
 gtccaagtac tccaactctg acgtcatcat ctacgtcgtt tgccgagagc gtggtaacga 900  
 gatgtctgag gtactgcgtg acttccctga gctgacggtg gagatcgagg gtgtgacgga 960  
 gtccatcatg aagcgtaccg ccctcgtcgc caacacatcc aacatgcctg tcgctgcccg 1020  
 tgaggcttcc atctacacag gaatcaccct ttccagtagc ttccgtgaca tgggttacia 1080  
 tgtgtccatg atggctgact cgacctccc ttgggcccag gctcttcgtg agatctcagg 1140  
 tcgtctagct gagatgcctg ccgattccgg ttaccctgcg tacctgggag cccgtctggc 1200  
 ctcttctac gagcgtgccg gtagagtcaa gtgtctcggg aaccctgaca ggggaaggtc 1260  
 ggtgtccatc gtgggtgccg tgtcgcgcc cggaggtgac ttctcggacc cgtgacggc 1320  
 ggccacgctg ggtatcgtgc aggtgttctg ggtctcgc aagaaactcg cgcagaggaa 1380  
 gcacttcccc tccatcaact ggcttatctc ttacagcaag tacatgcgtg ctttgatga 1440  
 cttttatgag aagaactacc ccgaattcgt gcccttagg actaaggtca aggagatcct 1500  
 gcaggaggaa gaggacctgt cagaaatcgt gcagttggtc ggtaaagcct cgctcggca 1560  
 gactgacaag atcacctcg aggtcgcca actgcttaa gacgacttct tgcaacagaa 1620  
 cagctactcg tcatacgate gattctgtcc gttctacaag accgtgggca tgcttaagaa 1680  
 catcatctcg ttctacgaca tgtcgcggca cgcggtggag tccacggccc agtccgaaa 1740  
 caaggtcacg tggaaactga tccgcgacgc catgggcaac gtactctacc aactctcctc 1800  
 catgaagttc aaggaccag tgaagacgg cgaggccaag atcaaggcag atttcgacca 1860  
 gctgttgagg gatatgtcc cgccttccg taacctcgag gactaagcac agccgtacta 1920  
 cagtacagta cagtaggag cgcccacgag ccgcgccgcg acatcctccg cagccgagag 1980  
 gacatcttta tcgacttgtt ttcatgttgt ctttttatt ataatttatt gattaatatg 2040  
 aggatattatt ttttcgtatt ctattcactg ccggagcgtt ttgagacagt ttttctcagt 2100  
 ctggagtgtt ttgcatttta tcgatattat cgagtgtcgg gcgtcgttaa ggoggtgctg 2160  
 ttagcgaggt atgcgttatg acacacgcat atatcgtaat aacagcgttg tttaaacggg 2220  
 tctgtgcgca ggccgagttc gtggcggtc gtgtgttat agtaattatg tagtgttaaa 2280

ES 2 439 696 T3

tatattacaa catcgattcc agaggatggt gtcgcgggct agaactccga cagcgcgaaa 2340  
 gcctacaaaag ggcgtggcct gtaaacggca caataaggcc gactaacaat tctccgttat 2400  
 ttgaaatagc agttcaaaca cagtcgtcac agtggcggta gtccgaatgt ttggacctgg 2460  
 gttggtgttt ataaagtctg cccaatctat tgtaaataata taacaggttc gctgttctag 2520  
 cccgcgggcc gttacggcgt ttagtgtttt tatgaaatct atttatgtac tatatcgatc 2580  
 ggtaaaccgt gatttataat caaatatcct cttgcattcc acgttgttgt tagaaatata 2640  
 gaattcaaaa cgtttgttgt tttcgagagc tttttacgct taatatggat gttcattcag 2700  
 tattaatata atgcgtacga gtacgcagta acaatagtca gcaactaatat gtctactcgc 2760  
 tgtttgaaat tctgtgacgt tacgtgttga gaaattatta taaataataa taaaatattg 2820  
 taaacaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2860

<210> 152

<211> 3097

5

<212> ADN

<213> Aedes aegypti

<400> 152

caggttggcc agtctttcag tcagtcagtc ttgtgatacc attttgcttc gctcgggtgtg 60  
 tggagtttgc atttttocca tcccactctc ctcgacaact gcagcaccta agagcagaag 120  
 gaagcagagc aggaggaacg gatcgttaaca atgtccaccc tgaagaagat ctccgatgag 180  
 gaccgcgagt ccaaattcgg atatgtgttc gccgtatccg gtctctgtcgt cacggccgag 240  
 cggatgtccg gttcggctat gtacgagtgt gtcgcgctcg gttactacga gctgggtcgt 300  
 gagatcatcc gtttgaaggt tgacatggcc accatccagg tatacagagga aacctccggt 360  
 gtcaccgtcg gcgatcccgt gctgcgtacc ggcaagcccc tctccgtcga actcgggtcca 420  
 ygtattatgy gtagcatctt tgacggtatc cagcgtccac tgaaggacat taacgaacty 480  
 accagctcga tctacatccc cgaaggggtgt gaacattccc tgcttgtccc gtacaggagg 540  
 ctggggattc aacccttga acgtaaagggt ttgggtctc acatcaccgg aagagatctg 600  
 tacggtttgg tgacagagaa tacctgggtc aagcacaagc tgttgggtccc gccacgcgcc 660  
 aagggtacag ttcggtacat tgctccaccc ggaattaca ccgtcgacga catcattctg 720  
 gagacggaat tcgacggtga gatcaacaag tggcttatgt tgcagggtgt gcccggtcgt 780  
 cagccacgtc cagtgactga gaagtgtccc gccaatcatic ctctgctgac tggtcagcgt 840  
 gtgttggaat cgctgttccc ttgtgtccag ggtggtacca ctgccatccc cggagctttc 900  
 ggttgcggta agactgtcat ctcgcaggcc ctgtccaagt actccaactc cgatgtcatt 960  
 atctacgtcg gttgcggaga acgtggtaac gaaatgtctg aagtattgag tgatttccct 1020  
 gagctgtcgg ttgagattga cgggtttacg gaggccatca tgaagcgtac cgcgctgggt 1080  
 gccaacacct ccaacatgcc tgtcgtgctc cgtgaagctt ccatctacac cggatttacc 1140  
 ttgtccgagt acttccgtga tatgggttac aacgtatcca tgatggctga ctcgacctct 1200  
 cgttgggccg aagctcttgc agaaatttcc ggtcgtctgg ctgagatgcc tgccgattcc 1260  
 gggtatcctg cctacctggg tgcaagttgt gcctccttct acgagcgtgc cggctcgtgc 1320

10

ES 2 439 696 T3

aagtgtctcg gtaaccctga acgtgaaggt tcggtgtcca tcgtcgggtgc cgtatcgccc 1380  
 cctgggtggtg atttctccga tcccgtcaca tccgccacce tcggtatcgt acagggttcc 1440  
 tggggtctgg acaagaaact ggcccagcgt aagcatttcc cctcgatcaa ctggttgac 1500  
 tcctacagca agtacatgcg cgcccttgat gacttctacg ataagaactt ccaggagttt 1560  
 gtaccactg cgtacaaggt taaggagatc ctgcaggagg aagaagattt gtccgaaatt 1620  
 gtgcagctgg tcggttaaggc atcgctggca gaaaccgata agatcacctt tgaggtagcc 1680  
 aagctgtca aggatgattt cctgcagcag aactcgtact cggcgtacga tcgattctgt 1740  
 ccgttctaca agacggctcg tcgtatgctg cgaaacatga tcggattota cgatattggt 1800  
 cgccacgccc tcgaaaccac cgcccagtcg gagaacaaga tcacctgga cgtgatccgt 1860  
 gactcgtgg gcaacatcct gtaccagctg tcgtcgtatga agttcaagga cccgggaagg 1920  
 atggcgaaga agatcaaggc cgatttcgac caactgtacg aagacctga gcaggcgttc 1980  
 cgcaacctgg aagattaat tctcccgcac attcgtggtc tcttcaatgc gaaattcttg 2040  
 aacagtttat tgtttcagta acatagcaaa gaaatggtcg tagcatagtg caaacaanaac 2100  
 atcaaaaatga gaaacacgaa acacagcaaa agtgtagggc cctccttggc atcatgataa 2160  
 accaacaaca tccattaagt aaaatgcttc taggtcacca ttttacaggc gtatttaggt 2220  
 ttaaacattt atttacacia attattgcaa gaaaagatt aagagaacia atctataaag 2280  
 cgagtgtaac atatacattt agaaacggcg aaacactaca acaactacag aaccacacgg 2340  
 cagaacagaa acaaatttta gtaggttaagt gatattgcaa gtgtttgccc acggcgtagg 2400  
 aaaaggtag cgaacggaat aacgttcaat cggaaattgt cttcgaaagt ttccgcttgc 2460  
 atgcgtgtct caaatcgaa taaaacgtat aaacaatcgt ggtgaaactt aacatcagt 2520  
 atgatataat caaaggggat taaaatgaaa cacgtggaca aaagatctat aaagaaaaac 2580  
 tctcagctag aatagttcaa gacgtggcga agcgtatcat aaatagaata atatgtaaac 2640  
 cacggttaat gggaaaataa gaagaaactt tcgattgagt atgttataga aacttatcca 2700  
 tgtatgatgt ataaatcgct aattaatcgt ataagaaata acagaacaag ttttattata 2760  
 ggtgtaagcc aatcaagttg ttatatcagt ttaaataatta ttagtgaat atagttttac 2820  
 ttttaatttt gtagtgtcgt ttttccatcg gtaggatcgg aaacgagaat cgatgattga 2880  
 ttgactgttg acaaatgaaa tgaaagttaa atttattatg cttttttggt tgtgtgaaca 2940  
 gaattgaaga gccgccgct cgtttcggtc aatgcaagcg accgacggct cgtatctgtc 3000  
 ctgtacattt ttgtcgtatga gcagaaaata tatgagaata aaaccctcta aaaaattgca 3060  
 ttccgcgtaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 3097

<210> 153

<211> 2533

5

<212> ADN

<213> Drosophila melanogaster

<400> 153

10

cgaaaacacg cacacagact gcaagtgtgt tagataataa gtgcagcaca agtccacact 60

ES 2 439 696 T3

tgagtaaaat aatccctaaa aaagccgaat atcaattagt tttccaagga gcttgaaaa 120  
 gtgcgtcga aaaacagaat aaagcaaat gtccaacctt aagcgtttcg atgatgagga 180  
 gcgtgagtcc aatatggac gtgtcttcgc tgtctccggt cctgtcgtca ccgccgaggc 240  
 catgtctgga tcagctatgt acgagttggt ccgcgtcggc tactacgagc tggtgggcga 300  
 gatcatcctc ctggaggggt acatggccac catccaggtg tacgaggaga cctctggcgt 360  
 aactgtcggg gatccggtgc tgcgtaccgg caagcctctt tccgtggagc tgggaccgg 420  
 tatcatgggc agcatctttg acggtatcca gcgtcccctg aaggacatta acgagctgac 480  
 cgaatccatc tacatcccca aggggtgtaa cgtgccagcgt ttgtcccggc tggccagctg 540  
 ggagttcaac cccctgaacg tcaaggtcgg ctcccacatc accggaggtg acctgtacgg 600  
 tctggtgcat gagaacactc tggtaagca caagatgatt gtgaaccccc gcgccaaagg 660  
 aacagtgcgc tacatcgccc cctccggcaa ctacaaggtc gacgatgtcg tcctggagac 720  
 cgagttcgat ggagagatca ccaagcacac catgttgagc gtgtggccag tgcgtcagcc 780  
 acgtcccgtg accgagaagc tgcccgcga ccaccccctg ctaccggac agcgtgtgct 840  
 cgactcgctc tccccctgtg tccagggcgg taccaccgcc attcccggag ctttcggtt 900  
 cggcaagact gtgatctgc aggctctgtc caagtactcc aactccgatg tcatcatcta 960  
 cgtcggttgc ggtgagcgtg gtaacgagat gtctgaggtg ctgcgtgact tccccgagct 1020  
 gtccgtggag atcgacggtg tcaccgagtc catcatgaag cgtaccgccc ttgtggccaa 1080  
 caoctccaac atgcctgtgg ctgctcgtga ggcctccatc tacactggta tcacctgtc 1140  
 cgaatacttc cgtgatatgg gttacaacgt gtccatgatg gctgattcca cctcccgtt 1200  
 ggctgaggct cttcgtgaaa tttctggctg tctcgtgag atgcctgccg attccggcta 1260  
 cccagctac ttgggagccc gtctggcctc cttctacgag cgtgccggtc gcgttaagt 1320  
 cttgggtaac cccgagcgcg agggatccgt gtccattgtc ggagctgtgt ctctctcgtg 1380  
 tggtgacttc tccgatcccg tgacctccgc cactctgggt atcgtgcagg tgttctgggg 1440  
 tctcgacaag aagttggccc agcgaagca cttcccctcg atcaactggc tcatctccta 1500  
 ctogaagtac atgcgtgctc tggatgactt ctatgacaag aacttccccg aattcgtgcc 1560  
 gctgcgtacc aaggtaagg agatcctgca ggaggaggag gatctgtctg agatcgtgca 1620  
 actggctcggc aaggcctctc tggccgaaac cgacaagatc acgctggagg tggccaagct 1680  
 gctgaaggac gatttctgc agcagaactc ctactcctcg tacgatcgtc tctgccctt 1740  
 ctacaagacc gtgggcatgt tgaggaacat catcgacttc tacgacatgg cccgtcactc 1800  
 cgtggagtct acggctcagt ctgagaacaa gatcacctgg aacgtgattc gtgaggcaat 1860  
 gggcaacatt atgtaccagc tgtcatccat gaagttcaag gaccccgtta aggatggtga 1920  
 ggccaagatc aaggctgact tcgagcagct gcacgaggac ctgcagcagg ctttcagaaa 1980  
 tctggaggac tagagaccgc gctggcccta cttttacact ctaatcttat atttgttata 2040  
 tagttaacgt ttaaaaatga aagcagtcaa aaaccatccg aaaagccta atcaaacacc 2100  
 aacaattccg tgctgcattc gatgaaaaac aaaagtcaa caaataccac aacttcttgg 2160

# ES 2 439 696 T3

```

tgctgctgag agatgtaaac attccggcct gcggtaata ctttccccta accacgcccc 2220
ctccgccct tgaaggcaa ctctaggcaa cagcaactac aacgtcctgc tatgtacttc 2280
catttacaac aacaacacca acatacactt gaataaaagt acacggacac tggcgcacac 2340
acaacacata cataaaagac acaaatatac atgcatgcat aaatagtatt attgtttaat 2400
gaatggaat tcttgtttat ttgtgaaaa agtcatgttt tctccctgtt tgtttgttaa 2460
atztatgtaa atatttaaag tatgaaatat taaatgtacg aataaagtgc aacaacaaat 2520
acatttaatg taa 2533

```

<210> 154

<211> 603

5

<212> ADN

<213> Bombyx mori

<400> 154

```

atgagttccc tcaagctgca gaagaggcct gcagcctctg ttatgcatg tggtaaaaag 60
aagggtgtgt tggatccaaa tgaatcaat gagatcgcaa acaccaactc cagacagaac 120
atccgtaaga tgatcaagga tggctctctc atcaagaaac ctgtagcagt aactcctcgc 180
gctcgtgtcc gcaaaaacac agaagcacgt agaaagggtc gtcactgtgg ctttggttaag 240
agaagaggta cagccaatgc gcgtatgcca cagaaggaac tatgggtaca aagacaaagg 300
gttttaagaa aattgctcct gaagtacaga actgccaaga agattgacag gcctctatac 360
cactcactct acatgaaggc gaaggtaat gtgttcaaga acaagcgtgt gctcatggag 420
tacatccaca ggaagaaggc tgagaaggcc aggacgaaga tgcttagcga ccaggctgag 480
gcccgcgcga ataaagtgaa ggaggcacgc aagcgccgag aggaacgtat tgcccgaag 540
aaggaggaac tgctgcagac cttcgtctaga gaagacgaag ccgctcttac cgctaagaag 600
taa 603

```

10

<210> 155

<211> 612

<212> ADN

15

<213> Drosophila melanogaster

<400> 155

ES 2 439 696 T3

```

atgagttctc taaagctcca gaagaggctc gcagcctccg tgctgcatg cggcaagaag    60
aaggtctggt tggatcccaa tgaatcaac gagatcgcta acacaaactc gcgtcagaac    120
attcgcaagc ttatcaagga tggctgcatc atcaagaagc ccgtcgtggt ccaactccgt    180
taccgtgtgc gcaaaaacac cgaggcccgc cgcaaggacc gtcactgcgg attcggaaaag    240
cgtaagggta ctgcgaacgc ccgcatgcct accaagctgc tgtggatgca ggcagccgcg    300
ttctgccgcc gcctgttgaa gaagtaccgc gacagcaaga agattgacag gcacctgtac    360
cacgacctgt acatgaagtg caagggtaac gtgttcaaga acaagcgcgt cctcatggag    420
tacatccaca agaagaaggc tgagaagcag cgcagcaaga tgctggctga tcaggccgag    480
gctcgccgac agaaggtgcg tgaggcccgc aagcgcgcgc aggagcgtat tgccaccaag    540
aagcaggagc tcatgcacct gcatgctaag gaggacgaga tcgctgcaa ggcgcgccacc    600
gcgggtcact aa                                                                612

```

<210> 156

5

<211> 567

<212> ADN

<213> Anopheles gambiae

<400> 156

10

```

atgcatgcat gcaagaagaa ggtgtggttg gatcctaataaat caatcaacga gattgaaac    60
accaactcgc gacaaaacat tcgcaaaactg atcaaggatg gtctgatcat caagaagccg    120
gtggtggtcc actcgcgtta ccgtgtgctc aaaaacacga tcgctcgcgc caagggtcgc    180
cactgcggtt atgtaagcgc aaagggtacg gccaatgcc gtatgcccc gaagctgctc    240
tggatgaacc gtatcgtgtg gctcgcctct ctgctgaaga agtaccgtga ggcaagaaa    300
atcgaccgtc acctgtacca cgacctgtac atcgtgcga agggtaacgt gttcaagaac    360
aagcgtatcc tgatcgagca catccacaag aggaaggcgc agaaggcccg ctccaagatg    420
ctgagcgtac aggccgaagc caagcgtacc aaggttcgtg aggcccgctc tcgctcgcgc    480
gaacgtattg ccaccaagcg ccaggagctt ctgcagacga tcgctaagga agaggagacc    540
gcgcagcatg ttgccgtac tggaaag                                                                567

```

<210> 157

15

<211> 652

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 157

ES 2 439 696 T3

cacggtgaga ggtgcatttg cacgatgagt tccttaaaac ttcagaagag gctagcagcc 60  
 tctgttatgc gatgtggtaa aaagaaagta tggttggacc ctaatgaaat caacgaaatt 120  
 gccaaacta actcaagaca gaacatccgt aagttgataa aggatggtct tattattaag 180  
 aagcccgtag ctgtacattc ccgtgcccggt gttcgcacaaa aactgaagc ccgcaggaaa 240  
 ggaaggcact gcggttttgg taaaaggaag ggtactgcta atgcccgtag cccgcaaaag 300  
 gaattatgga ttcaacgcat gagagttttg cgtcgtctcc ttaaaaaata caggaagct 360  
 aaaaaattg acagacatct ataccactca ctctacatga aggccaagg taacgtattc 420  
 aagaacaagc gtgtccttat ggaatacatc cacaagaaga aggcagagaa agcccgtagc 480  
 aagatgttgg cagaccaggc caatgccaga aggatgaagg taaaacaggc tagagaaaga 540  
 cgtgaggaac gtatcgccac aaagaaaca gaagttttgc agaactacat gagggaggat 600  
 gaagctgagg ccactaagaa ataagttaat tgttttataa gatgactata tt 652

<210> 158

<211> 402

5

<212> ADN

<213> Anthonomus grandis

<400> 158

tgagatgtgg taagaagaag gtatggttgg accctaataa aattaacgag attgccaaca 60  
 ccaactcgag gcaaaacatc cgtaaattga tcaaggatgg tttgatcatt aagaaaccgg 120  
 tggcagtgca ctctagggct cgtgtccgta aaaacacaga agctcgcagg aagggaaaggc 180  
 actgcggttt cggtaagagg aaaggtacag cgaacgctcg tatgcctcaa aaggaactat 240  
 ggatccaaag gatgcgtgtc ttgaggcgtc tcttgaaaaa atacagggaa gccaaaaaga 300  
 tcgacaggca tctgtaccac gcctgtaca tgaaggcaa gggtaacgtg ttcaagaaca 360  
 agagagtgtt gatggaatac atccacaaga agaaggctga ga 402

10

<210> 159

<211> 403

15

<212> ADN

<213> Tribolium castaneum

<400> 159

# ES 2 439 696 T3

```

tgagatgctg taagaagaag gtatggtag atccgaacga aatcaacgag atcgccaaca   60
cgaattcacg ccagaacatc cgcaaattga tcaaagatgg tctcatcatc aaaaagcccg   120
tcgctgtgca ctccagagcc cgcgtccgca agaacacgga ggcccgcagg aagggacgcc   180
attgctgctt cggcaagagg aaaggtacag ccaatgctcg tatgcccag aaggagctct   240
ggatacagag gatgcgggtc ttgaggaggc tcctcaagaa gtatcgcgag gccaaaaaga   300
tcgacagaca tttttaccat tcgctgtata tgaaggccaa gggcaacgtc ttcaagaaca   360
agagggtcct tatggagtac atccacaaga ggaaggccga gaa                       403

```

<210> 160

<211> 23

5

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 160

ggtgacatgg ccaccatcca ggt 23

<210> 161

15

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20

<223> Secuencia artificial

<400> 161

acccagaac acctgyacra tacc 24

25

<210> 162

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 162

5 ttaatcgcac tcactatagg gagaccagtg tgctggaatt cgcc 44

<210> 163

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Secuencia artificial

<400> 163

15 ttaatcgcac tcactatagg gagaggatat ctgcagaatt cgcc 44

<210> 164

<211> 45

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

25 <400> 164

ttaatcgcac tcactatagg gagacctgct cgtagagctc ggacc 45

<210> 165

<211> 44

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

35

<400> 165  
 ttaatacgac tcactatagg gagaggcacg ctcgtagaac gagg 44

5 <210> 166  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia artificial

<400> 166  
 tgm gatgygg yaaraagaar gt 22

15 <210> 167  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia artificial

<220>  
 <221> misc característica

25 <222> (23)..(23)  
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 167  
 tgm gatgygg yaaraagaar gtn tgg 26

30 <210> 168  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

5

<221> misc\_feature

<222> (6)..(6)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 168

10

ttctcgcct tcyctygtg gatgt

25

<210> 169

<211> 2713

<212> ADN

15

<213> Diabrotica virgifera

<400> 169

ES 2 439 696 T3

cggacgcgtg agcggacgcg tgggcgacg cgtgggcgga cgcgtgggcg gacgcgtggg 60  
 cggacgcgtg ggcggacgcg tgggtggcaa cccacgcgtc cgctagttag tgctcgcg 120  
 cgagcgcgcc cgccccgcc cggaaagctg cattaactagc taatctgaac gtctgtcgta 180  
 attttgtttc atttgtggtg taaaagttaa aactcatcaa ccaaaatgcg tgaatgtatc 240  
 tcagtccatg ttggccaagc cggagtccaa atcggtaatg cctgctggga gttgtactgc 300  
 ctggaacatg gcatccaacc tgacggtcag atgccatcag acaagactgt tggaggagga 360  
 gatgacagtt tcaacacatt cttcagtga actggtgccg gcaaacatgt acctagagca 420  
 gtattttag atttggaacc aacagtagta gatgaagtac gtaccggcac ataccgtcaa 480  
 ttgttcacc cagaacaact catcactggc aaagaagatg ccgccaataa ctatgctaga 540  
 ggtcactata caattggtaa agaaatagtt gacttggat tggacagaat ccgtaaatg 600  
 gctgatcaat gtactggact tcaaggtttc ttgattttcc actccttcgg tgggtgtact 660  
 ggatctggtt tcaattcttt gttgatgaa cgtctatctg ttgactatgg taaaaatca 720  
 aaactggaat tcgcatcta cccagctcct caagtatcta ctgctgtagt agaaccatac 780  
 aactccatct tgaccacca caccactctt gaacactcag actgtgcctt tatggtagat 840  
 aatgaagcca tctatgacat ctgcagacgt aatctagaca togagcgccc aacctacacc 900  
 aactgaaca gacttattgg ccaaatcgta tctcaatca cagcttctct aagattcgat 960  
 ggtgctctaa atgttgactt gacagaatto caaactaact tggttcctta ccctcgatt 1020  
 cacttcctc ttgtcaccta tgccccagta atttccgctg aaaaggctta ccatgaacaa 1080  
 ctttccgtag ctgaaatcac caatgcctgt ttcgaaactg ccaaccagat ggtaaaatgt 1140  
 gatcccagac atggtaaata catggcttgc tgtatgtgt acagagggga tgttgtacca 1200  
 aaggatgtaa atgctgctat tgcaaccatt aagaccaaac gtaccatcca attcgtagac 1260  
 tgggttccaa ctggtttcaa agtaggtatc aactaccaac caccaactgt tgtacctgga 1320  
 ggtgatttgg ctaaagtaca acgtgccgta tgcattgtgt ccaacactac agctattgct 1380  
 gaagcctggg caagattgga ccacaaatc gatcttatgt atgccaagag agctttcgtc 1440  
 cactggtatg taggagaggg tatggaagaa ggtgaattct ctgaagctcg tgaagatttg 1500  
 gctgcttttc ttatcatctc tatttttttt acgatcctta accgcataac accgtatcta 1560  
 tcattgtgaa attaggtgtg aaaggtgttt aaaaatgagg ttccttattc tacttgccgt 1620

ES 2 439 696 T3

attggctgta gctgtgaatg ctacatcaat ccaccaacaa tgggctacat ttaaggtaaa 1680  
 ccattccaag aagtacggac atcttaaaga agagcaagtt cgcttccaag ttttctctca 1740  
 aaatctccgc aaaattgaag aacacaatgc aagataccag aatgggtgaag tgtccttcta 1800  
 cttgggggtt aatcagttcg cagatatgac ttcagaggaa ttcaaggcta tgettgactc 1860  
 ccaactcatt cacaagccta agcgaaacat tacatccgc tttgtagctg atcctcaatt 1920  
 gactgttcca gaatcaattg actggagaga aaagggggca gttgctccca taagggacca 1980  
 aggccaatgc ggatcatggt gggcatttag tgcagctggt gctcttgaag gacaaagatt 2040  
 tttaaagcag aacgtactag aagtactgag taccacaacag ttagtagatt gttccgggtga 2100  
 ttacgacaat gaaggctgca atgggtggtg gccccattgg gcatataact acattaaaga 2160  
 tcatggcctc tgtctagagt ctgattacaa gtatcaagga ttagacggtg actgcaaaca 2220  
 gtgtaatccg gttatcaaaa ccatcaatgg ctatgcatct gtagatcaaa ctgaagaagc 2280  
 acttaaggag gctgtaggta ctgctggccc aatatcagta tgtgtcaacg ctaattggga 2340  
 ctggcaactg tacagcgggg gtatccttga tagccaaagt tgtccaggcg gcattttaaa 2400  
 ccatgcagtt ttagctgttg gatatggttc agaaaatggt aaagactttt ggcttatcaa 2460  
 gaattcatgg gacacttatt ggggagaagc aggttatttg agattagtac gtggtacaaa 2520  
 ccagtgcggt atcaatgaag tggccgatta tcctctccta taattttaaa aattgtcatg 2580  
 ccttacagtt tatataatga aacatgaata aaaatattat aactttaaaa aaaaaaaaaa 2640  
 agggcggcgg acttttttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaca aaaaaaata aaaaaaaaaa 2700  
 agggggggcc ccc 2713

<210> 170

<211> 1363

5

<212> ADN

<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 170

cccaccogtc ccgtggtcga gaaaagtact aatagtgata tctacgtttt togtttgttt 60  
 aaaatgtagt gacatttctg ttaaagtctt caaaaacgga gacgtagtta atttaaatat 120  
 taactcaatt tctgagttaa agcaaatgt agtccacaga ggtgaactag acgacattga 180  
 aattgaggac caaaatgttc cagtagtacc aaacaatttg ctgaatggaa tcaactgccac 240  
 ggaacttcac attattagat cccaagtaag agatggtgaa cctggtgcat tcgatggagc 300  
 ttctatggtt aacctaattg tgtatgaaaa ccaaattgca agaataagaa aaggtatatt 360  
 taacaaaaac tcatttaata tacttgcttt gcagaataac gttatatcta atatagaaga 420  
 tgaagccttt gacggtacaa ccacgcgat actggacttt ggttttaaca agatgaaaaa 480  
 attgacttca aaaatgttcg ctggttcaaa tattacaaat cttaacttac aatcgaacct 540  
 aataagtaac atagaagatg gtacctttca gaaaatcgat aatttgaata aattagactt 600  
 aagcggtaac caattggaag ttattggaca cgtctttaga aacctgacaa acctaaatga 660  
 attgcacttg gatgaaacc gaatcaaac acttgaacct ggatgctttg gtggttctg 720

10

ES 2 439 696 T3

gatctactgg ctttattttg caggtaacca actgactcat attgtaaagg gagtgtttta 780  
 taaagtacca gtatccttat tggatttcac taataacaaa atttcaaaaa ttgataaagg 840  
 agccttagct ggtctttcaa cgctaacatt tgttcagtta tctaataaca atataggaga 900  
 tttgaagctg tccactcttg gcgatctcaa tactgcttta aatggtctat ctttgagtga 960  
 taacggcatt tcaaatatcg atattggagt gttcaaaaat actaaaatcg atatgttgga 1020  
 cttaagcaaa aaccatataa aatcaattaa aaaaggactg ttccagaatg ttaaaatgta 1080  
 cactattaat ttgagtgaaa atgaaattac tgaaatagag gaagatgctt ttggtgatat 1140  
 cgaggattha agtcacatag atgtgagctt gaacaaactt acagaagtta agaagagaat 1200  
 gttcagtcta ccattggatg aagttaattg gaagataatg taataactaa aatcgataat 1260  
 gatgccctc gtgtccttcc gctgtcacgt cttcagataa aaataatcct attggtgca 1320  
 agaacaagc ttaaaataat ggtgtattta ataataatgg aat 1363

<210> 171

<211> 1215

5

<212> ADN

<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 171

aaaagagtga ggaacaggt taattataat gacggaggaa tgacaactga cacacgagaa 60  
 gatacgacat ggcaagaaaa tctctctgat taccattctg acttttctgc gggatcggat 120  
 gaggataagg aagacgatga tttcgatgag aagaacgacg ccgatttaag cagaaggagt 180  
 cgaagaaaga tgaaaggaa agacgagaag gatcgtcctt taccaccgtt actagccaga 240  
 gttggcggca atattgaagt actcggtttt aatgccaggc agcgtaaagc gttccttaat 300  
 gctattatgc gctacggaat gccaccacaa gacgctttca attcacagtg gctggtgaga 360  
 gatcttcgag gaaaatctga gaagatattc aaggcttacg tgtctctctt tatgaggcat 420  
 ctttgcgaac ctggtgcaga taatgctgat acatttgcg acggtgtgcc gagggaagga 480  
 ctgagtaggc aacatgtttt gacaaggatt ggtgtgatgt cacttataag aaagaaggtt 540  
 caggagttcg aacacatcaa cggcgagtat agcatgccg aagtaatcaa aaagagcatt 600  
 atggatcaaa ataaaatcaa tgccgccggc accgccacca caagcgaagc agaaacgcct 660  
 aaaagtgcta ctaccagtac tagtgetacg ccagctacaa gtgctgctcc cagtcccgt 720  
 cccacacaag gagaagataa agataaggat aaagattccg ttcagagtga cgaataataa 780  
 gataaagaag tggtaataa aacggaacc gaagatgaag agaagaaaac gggagaatct 840  
 tcaacagaaa agccgaaaac tgaaccggaa gaagtgaag aagcttctcc gaaaccgaa 900  
 attcccgaag ctagtccga agctgataaa tctgagatca aatccgaagt cgatacctcg 960  
 tctgtaacca gcgaggaaaa gaaagaagag aaagaggaag aggcacaaaa ggaagaaccc 1020  
 gaagagacca aatggaaat acaggaggag gaacttgta aagaggagaa aaaagaagaa 1080  
 gaggatgata agaagaagga ggaattaag aaagaggtgg aaaagaagga agaggatgac 1140  
 gttatggta ttgatgatga taaagataag aaggacaaaa aggaaatcga tctcgaagcc 1200  
 aagaagcgtt tcatg 1215

10

ES 2 439 696 T3

<210> 172

<211> 3363

<212> ADN

<213> *Diabrotica virgifera*

5

<400> 172

```

accacgcato cgcccacgcg tccgcccacg cgctcgccca cgcgtccgat tgaattactc      60
taataatTTTT tttttatTTTt ctttttttat ttatttaata attttaaacta ttttaacttt      120
aattataaac caaaatattt taaaactaaa aaaactaatt taaaattcaa ttgaaaatga      180
taataaatTTt attttcttct ttcgacccta catctaattt taatttacca ataaactgat      240
taagaacagt attaggtcta ttaattattc catctagatt ttgattaatc ccctctcgtt      300
ataattattt atgaataaag attattataa cattacataa agaatttaaa gttttaattg      360
gaaattataa atoccaaagga agaacattaa tttttatctc actatttaga ttaattttat      420
ttaataatTTt tcttgatta ttcccgata tttttactag aacaagacat ataactttaa      480
cattaagatt agctttacca ttatgattga gatttataat ttatggatga ataaataata      540
ctattcatat attagctcat ttagtctctc aaggactcc tccgatttta ataccattta      600
tagtttgat tgaacaatt agaaatgtaa ttcgacctgg aacattagca gtacgtttaa      660
ctgctaatat aatcgcagga cacttattaa taactctttt aggaaact ggaccaataa      720
tatcaatcta tatattaaat attttaatta ttgtccaact ttactatta attttagaaa      780
cagcagtatc tataattcaa tttatgtat ttgctgtttt aagaacacta tattctagag      840
aagtaaatta atgtcaaac ataaaaatca tccttatcat ttagtagata ttagaccatg      900
acctttatta ggagctttta gagcaatatt aacaatatta ggaataatta aatgatttca      960
tttatataat aataatttac taataattgg attattaatt acaagattaa ttatatatca     1020
atgatgacga gatattgtac gagaaggaac ttatcaaggc cttcatacct ttagtagtta     1080
ctaaaggttt acgttgagga ataattttat ttattacttc agaagtatta tttttatat     1140
catttttttg aggatttttt catagatcat tagcaccaac tattgaatta ggaactttt     1200
gacctcctaa aggaattcaa gcctttaacc cattagaaat ccctttatta aatactttaa     1260
ttcttttaac ttogggatta actgtaactt gagcccatca tagoctaata gaaaaataat     1320
ttttctcaag gacttcaagg attaatTTTT acagtaacat taggaattta ttttactatt     1380
ttacaaggat atgaatatat tgaatcacct tttgcaattt ctgattcaat ttatggatct     1440
tcatttttta tagcaacaggg ttttcatgga ttacatgtaa ttattggaac aaccttctta     1500
ttaatttggt taattcgcca ttatttaaatt ctttttcat cgacacatca ctttggtttt     1560
gaagcagcag cttgatactg acattttgta gatgtagtat gattattctt atatatttca     1620
atttactgat gaggtagatt gagtaaatac gtctaccgtt ctcctttaa tgacgetatt     1680
tgtgtcctcg aaagagagca aaagtgccca tggaaatccga aggetgacag atctacctca     1740
attcatacaa cggtaattg gcaagctcca cgtccaaaaa tactgccaaa tgcttgcac     1800
gcaattggta atactcatt gatcaagctt aacagaatac ctcagcaaga aggtttggaa     1860

```

ES 2 439 696 T3

tgtgatatat atgtaaaatg tgagttcttt aatcctgggtg gatcagtaaa agatcgcattg 1920  
 gaaacagaa tactgacaga tgccgagaat gaaggatct taaaaccagg atgtaccatt 1980  
 atagagccgt cttcaggaaa tactggcatt ggtttggcta tggcagctgc tattaagga 2040  
 tatagggtga taatcgtaat gtcagaaaaa atatccaaag agaaagaata cgtaatgaga 2100  
 gctttgggag ctgaagtat tagatgtcct gtcacagcta attcgttttc tccatatgga 2160  
 atgtttggtg ctgtccatcg tttatcaaaa gaaattccca acagtattat ttttgatcag 2220  
 ttctctaate ccggaaatcc actgactcac tacgatacta cagcagaaga aatttatgat 2280  
 caatgagaca aaaaagtaga tatgataata atgggagctg gaacaggtgg taccgttacg 2340  
 ggtataggaa gaaaatttaa agagatttct cccaatacgg aaatcgtttg tgcagatcca 2400  
 atgggatcat cttttgcttt accagaaatt ataaataaaa ctgacgttac tttctgggag 2460  
 atagaaggtg tgggctacga tttcattccc tcaaccttag accgcaaagt cattgacact 2520  
 tggattaaag taggtgatga gaatgcctg ccaatggcaa gaaggttgat taaggatgaa 2580  
 ggcttttga ttgggctag cagtgagct atgatgtggg cggctattca agcagcgaaa 2640  
 gctaaaaatt atggccctgg taaaagggtt gtagttatgt taccagatag tattaggaac 2700  
 tacttaaca agttcgtatg tgaccaatgg atggaagagc gaaatcttca gccttgtgta 2760  
 aatacaaca accaccctg gtggaattta aatgtctccc aattaaatct tcctgtacca 2820  
 caaactgtac cgataaatc ttccattgaa cagactttga atctaataaa gaaactgga 2880  
 ctaaccaga tacctgcatt ggatgatcaa ggggggtgtg ttggagtact ttcaatgcag 2940  
 ctaattatta acaacttac atctggtaat gctacactca atgaccaat agcagatgct 3000  
 atagaccgac tttatcccag agttgagaaa tctgctaata ttggactcgt ctcaagagta 3060  
 ttggaactg agccttattt ggtaattttg gatacacaag gtaaaggacc ttccaagata 3120  
 aataagcctg caggcgtgt aactccttta gattttctac agtttatcca gaagcagcat 3180  
 taaatataga ggagactaat atttccacca ttaacaaaa gtaatcaca taaagtgata 3240  
 aaataaataa tacctaataa aatagaaata ttagaaataa tagaaattat agattataat 3300  
 aaataaataa gtattataat caaaaaaaaa aaaaaaggg gcggcgcccc tttttttttt 3360  
 ttt 3363

<210> 173

<211> 843

5

<212> ADN

<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 173

ctcaataat tatgcaaaaa atttaaaata gtatttcgag gagaaattct ttataaaaa 60  
 aattgtatct ttctttatat ttctgggtgat atttatgaaa aacacaccag caatatgttt 120  
 gctatatcga ggagatcaat agctgcttta acacaaatca gatcaaagac agacaaggcc 180  
 gttttggacg aaattattcg agtagatcat gctggagaat tgggagcaga tcgtatttat 240  
 gcaggccaga tgttcattct aggcagcact tcaaaagcac ctttgataag acatatgtgg 300  
 gaacaagaaa aacatcaca agctacattc gaagatctaa ttagaaaaaa acgtgttaga 360

10

ES 2 439 696 T3

cctacagtaa tgactcctat ttggaatggt gcaggcttcg ccttaggagc aggatcagca 420  
 ttgcttgag acaaagcagc tatggcgtgt actgtggctg tcgaaacagt aattgtagat 480  
 cattataatg accaactgag aactctgttg gaagatccag agtgtgataa agagcttgta 540  
 gaaactatta agaagtttag agacgaggaa caagaacatc atgacatgg cattgatcag 600  
 ggagcaaagc agactccttl ttatgaagcg tttactaatg tcattaaagc tggatgcaaa 660  
 gcagctatag caatatcgaa agtagtttaa cttgtgttta tgtacatatt atgtagttga 720  
 ttgtgaaata tatgttgta aatttgtaaa gtattgacag tattatataat ttttgatata 780  
 aaagttagtc ccactatgtg tacagaaaaa tctaataaaa taaatcaat ttaaatacag 840  
 att 843

<210> 174

<211> 704

5

<212> ADN

<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 174

aaagaccttg aagatcttct accatggcat gagaagcctg tgaagataca ggtcttagtt 60  
 ctagacatgt agagggacat aatctgtggt atattttaga tcacaaaaga gtgcaattaa 120  
 ggctgttggt tgatgagtac tagacaggaa gaaagagcag actcccagga tatctcgtgg 180  
 ttgagtctta tgatcaacaa tatacatatt ttgcatcaga atcttgatag atcaggctat 240  
 cttctaatta ttctctatt tttgttttt ttctcgagtt agctcagttt tttcctattt 300  
 ttttttgggt acttttgcta gatataatctt acacatactc atttttatga gtcttaagtg 360  
 caatacgttg gtaacggaat actggttatt tgtcattcct tccttgtcgt acctagggtg 420  
 tttctcttta cttcaatagt tacaatgact atttgatttt tgattgtgtc aagctataca 480  
 agaaataaga gagtaatcag gagagagaaa gagagaaaag attgagtaat ctgtaagaca 540  
 tcaaaagatg aaaagaccta gaacatcttc tatcatagtt gtaagaggat gatgaaaggg 600  
 acaggtatta gttcaatcca gataaaaaat gaagtgttaa aagacataga agaaaaactt 660  
 ttgtgtacag tcgtacagta gacataggaa tacagcgaag atgc 704

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que contiene dos o más agentes pesticidas diferentes, cada uno tóxico para la misma plaga del gusano de la raíz del maíz, en la que el primer agente pesticida es una molécula de ARNb que funciona suprimiendo una función biológica esencial en una o más células de la plaga del gusano de la raíz del maíz, y en la que el segundo agente pesticida es una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* está seleccionada de una Cry3, una TIC851, una CryET70, una Cry22, una VIP, una TIC901, una TIC1201, una TIC407, una TIC417, una proteína insecticida binaria seleccionada de CryET33 y CryET34, CryET80 y CryET76, TIC100 y TIC101, y PS149B1, y quimeras insecticidas de cualquiera de las proteínas insecticidas precedentes.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho gusano de la raíz del maíz es una especie de *Diabrotica*, seleccionada preferentemente de *Diabrotica virgifera virgifera* (gusano de la raíz del maíz occidental, WCR), *Diabrotica barberi* (gusano de la raíz del maíz del norte, NCR), *Diabrotica virgifera zea* (gusano de la raíz del maíz mejicano, MCR), *Diabrotica balteata* (gusano de la raíz del maíz brasileño, BZR), *Diabrotica viridula*, *Diabrotica speciosa* y *Diabrotica undecimpunctata howardii* (gusano de la raíz del maíz del sur, SCR).
- 15 4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en una célula de planta.
5. Un procedimiento para controlar una plaga del gusano de la raíz del maíz que comprende proporcionar en la dieta de la plaga del insecto dos o más agentes insecticidas tóxicos para la misma especie de insectos, en el que un primer agente insecticida comprende una molécula de ARNb expresada de una secuencia de ADN, en el que dicha molécula de ARNb inhibe una función biológica dentro de dicha plaga cuando es ingerida por dicha plaga, en el que una parte de dichas secuencias de ADN que consisten en al menos 21 nucleótidos contiguos presentan del 85% al 100% de identidad de secuencias de nucleótidos con una secuencia codificante seleccionada de SEC ID N°: 1-143, 169-174 y los complementos de las mismas, y en el que un segundo agente insecticida se proporciona junto con el primer agente insecticida en la dieta, en el que dicho segundo agente insecticida es como se define en la reivindicación 1 ó 2.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicha secuencia codificante derivada de dicha plaga está seleccionada de SEC ID N°: 1-143 y 169-174.
- 25